

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 517 024 A2**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 92108381.2

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/13, C07K 15/28**

(22) Anmeldetag: 18.05.92

(13) Priorität: 03.06.91 DE 4118120

(14) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
09.12.92 Patentblatt 92/50

(23) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT
SE**

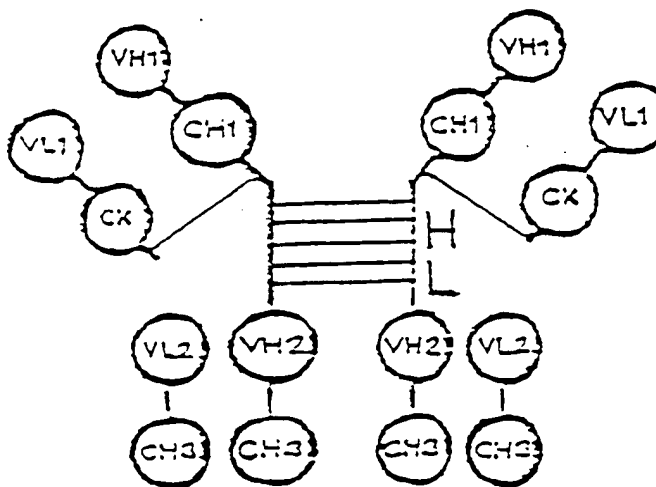
(24) Anmelder: **BEHRINGWERKE
Aktiengesellschaft**

**Postfach 1140
W-3550 Marburg 1(DE)**

(72) Erfinder: **Bosslet, Klaus
An der Haustatt 64
W-3550 Marburg(DE)
Erfinder: Seemann, Gerhard
Weissdornweg 32
W-3550 Marburg-Einhausen(DE)**

(54) **Tetravalente bispezifische Rezeptoren, ihre Herstellung und Verwendung.**

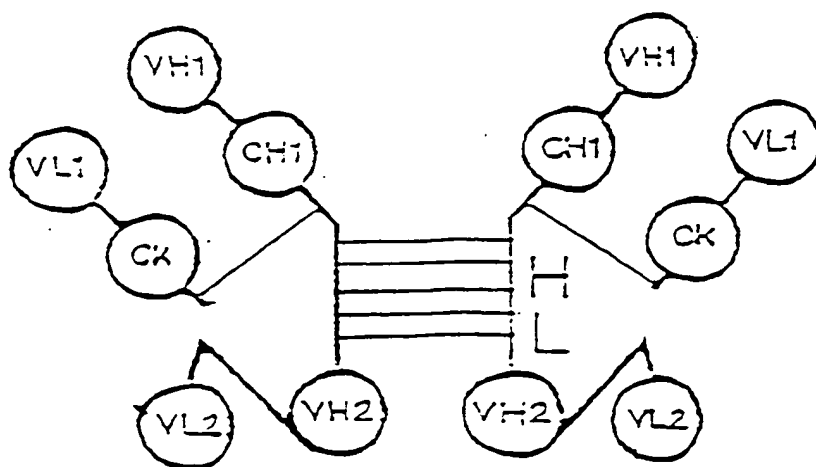
(57) Die Erfindung betrifft bispezifische, tetravalente Rezeptoren nach Formel I



Formel I

oder Formel II

EP 0 517 024 A2



Formel II

gegen ein tumorassoziiertes Antigen und gegen ein gegen Tumoren wirksames Agens.

Die Erfindung betrifft tetravalente bispezifische Rezeptoren, die gentechnisch durch Fusion der DNA, die für die schwere Kette eines F(ab')₂ Fragmentes eines Antikörper (I) kodiert mit (a) DNA, welche für die schwere Kette eines F(ab')₂ Moleküls eines zweiten Antikörpers (II) kodiert, bei dem die C_H1 Domäne durch eine C_H3 Domäne ersetzt ist (Formel I), oder mit (b) der DNA, die für ein "single chain" F_V-Fragment eines Antikörpers (II) kodiert (Formel II), mittels geeigneter Linker hergestellt werden. Die Expression dieser Fusionsgene in Säugerzellen zusammen mit den Genen für die entsprechenden leichten Ketten, welche im Falle des Konstruktes (a) zum einen aus einem V_L Exon der Spezifität I und einem C_K Exon und zum anderen aus einem V_L Exon der Spezifität II und einem C_H3 Exon und im Falle des Konstruktes (b) nur aus einem V_L Exon der Spezifität I und einem C_K Exon besteht, ergibt tetravalente bispezifische Rezeptoren.

Die C_H1 Domänen sind dabei mit den V_H2 Domänen über 1 bis 10 Hinge-Regionen (H) und einen geeigneten Peptidlinker L verbunden. Vorzugsweise werden die in der Europäischen Patentanmeldung EP-A2-0404 097 beschriebenen Antikörper-Spezifitäten eingesetzt. Dies sind u.a. zum einen Spezifitäten, die gegen ein auf der Zellmembran oder im Interstitium befindliches Epitop eines tumorassoziierten Antigens gerichtet sind. Zum anderen sind dies Spezifitäten, die gegen hochmolekulare oder niedermolekulare Liganden gerichtet sind, die ihrerseits ein gegen Tumoren wirksames Agens binden oder aber direkt dieses Agens binden.

In der EP-A2-0404 097 werden bispezifische und oligospezifische, mono- und oligovalente Rezeptoren beschrieben, die gentechnisch durch Fusion von für F(ab) Fragmente von Antikörper zweier oder mehrerer verschiedener Spezifitäten kodierende DNA mittels geeigneter Linker hergestellt werden. Vorzugsweise ist eine Spezifität dabei entweder gegen ein auf der Zellmembran oder im Interstitium befindliches Epitop eines Tumorassoziierten Antigens (TAA) oder gegen ein Epitop im Tumorendothel (TE) gerichtet, während die weiteren Spezifitäten hochmolekulare oder niedermolekulare Liganden betreffen und z.B. mit den Komplexonen Äthylendiamintetraacetat bzw. Diäthylentriaminpentaacetat in Yttrium 90 komplexierter Form (EDTA-⁹⁰Y bzw. DTPA-⁹⁰Y) reagieren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bindung mit den Komplexonen am Komplexon-Rezeptor-Arm über fos-jun Interaktion (oder auch Avidin-Biotin Interaktion). Weitere bevorzugte Spezifitäten haben katalytische Eigenschaften.

Bispezifische Antikörper wurden bisher nach folgenden Methoden hergestellt

- chemische Kopplung von Antikörpern verschiedener Spezifität über heterobifunktionelle Linker (H. Paulus, Behring Inst. Mitt. 78, (1985), 118-132)
- Fusion von bereits vorhandenen Hybriden, die verschiedene monoklonale Antikörper (MAK) ausscheiden, und Isolation des bispezifisch-monovalenten Anteiles (U.S. Staerz und M.J. Bevan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, (1986) 1453-1457)
- Transfektion der leichten und schweren Kettengene zweier verschiedener MAK (4Gene) in murine Myelomzellen oder andere eukaryotische Expressionssysteme und Isolation des bispezifisch-monovalenten Anteiles (U. Zimmermann, Rev. Physio. Biochem. Pharmacol. 105 (1986), 176-260; J. van Dijk et al., Int. J. Cancer 43, (1989), 944-949).

Solche bispezifische Antikörper werden zur Therapie und Diagnostik von malignen Tumoren eingesetzt. Das Prinzip des Verfahrens besteht darin, daß im ersten Schritt durch Injektion des bispezifischen Makromoleküls über längere Zeiträume und mit hohen Dosen eine Absättigung der Epitope, die von einer der beiden Spezifitäten auf den Zielzellen erkannt werden, erreicht wird. Im zweiten Schritt, der aus einer mehrtägigen Unterbrechung der Behandlung besteht, findet die Autoelimination des unspezifisch adsorbierten bispezifischen Antikörpers aus den Nicht-Zielgeweben statt.

Diese Autoelimination kann durch Injektion eines mit Zuckerresten, vorzugsweise Galactose gekoppelten antidiotypischen Antikörpers, der gegen den Anti-Tumor-Arm des bispezifischen Rezeptors gerichtet ist, beschleunigt werden.

Der dritte Schritt des Verfahrens besteht in der i.v. Injektion eines radiomarkierten, hydrophilen, sich nicht in Zellen anreichernden niedermolekularen Liganden mit kurzer Verweilzeit im Organismus, der hohe Komplexkonstanten für beta- und gamma-Strahler wie ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁹Re, ^{99m}Tc oder ¹¹¹In hat und an den die zweite Spezifität des bispezifischen Antikörpers mit hoher Affinität bindet. Durch diesen Schritt wird eine Anreicherung des radioaktiven Liganden, verbunden mit längerem Verbleib am Zielgewebe erreicht, was die selektive Zerstörung des Zielgewebes zur Folge hat bzw. eine Diagnostik beispielsweise von Metastasen ermöglicht.

Wir haben gefunden, daß tetravalente bispezifische Rezeptoren gemäß Formel I oder Formel II besonders gut gentechnisch herstellbar sind, da sie wesentlich effizienter exprimiert werden als andere Konstrukte. Hinzu kommt, daß die Avidität der ursprünglichen Antikörper zu den entsprechenden Antigenen bei den erfindungsgemäßen Konstrukten erhalten bleibt. Bevorzugt sind Konstrukte mit 1 bis 5, ganz bevorzugt 1 Hinge Region zwischen C_H1 und V_H2, da solche Konstrukte besonders effizient in BHK-Zellen exprimiert werden. Als Linker werden vorzugsweise die Sequenzen entsprechend der Peptidsequenz (Gly-

Gly-Gly-Gly-Ser)_x mit x = 3 bis 5 oder GEAAPAAAPAAAAAGG eingesetzt. Im übrigen werden die in vorgenannter EP-A2-0404 097 beschriebenen oder bevorzugten Antikörper-V-Gen-Fragmente bzw. Spezifitäten auch hier vorzugsweise eingesetzt.

5

10

15

20

25

Formel I

30

35

40

45

Formel II

- 50 H = Hinge
 L = Linker
 — = Peptidbindung
 — = Disulfidbrücke

Im folgenden wird beispielhaft die Konstruktion eines Fusionsgens beschrieben, welches für ein
 55 tetravalentes bispezifisches Rezeptormolekül kodiert. Wenn nicht anders vermerkt, sind die dabei verwendeten Techniken dem Buch "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" entnommen (T. Maniatis et al., 1989). Weitere Einzelheiten sind in EP-A2-0404 097 beschrieben, auf die hier besonders Bezug genommen wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft folglich bispezifische tetravalente Rezeptoren gemäß Formel I oder

Formel 11, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung. Vorzugsweise ist eine Spezifität gegen animale oder humane tumorspezifische Antigene gerichtet und die andere Spezifität besitzt katalytische oder enzymatische Aktivität oder ist gegen einen Komplexbildner gerichtet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stammt eine Spezifität von den monoklonalen Antikörpern mit den variablen Regionen gemäß Tab. 2, 3, 4 oder 5 aus EP-A2-0404 097.

Beispiel 1:

Ein Derivat eines M13 Phagen (V_H PCR), welches den 5' Teil eines schwere Ketten Gens bestehend aus Promoterregion, Signalexon, Intron 1, V_H Exon und Intron 2 enthält (R. Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 3833-3837, 1988) wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und BamHI gespalten, das Insert isoliert und in einen HindIII/BamHI gespaltenen KS+ Phasmid (pBluescript KS^R+, Stratagene LaJolla, CA, USA) kloniert. Durch Restriktionsanalyse und Nukleinsäuresequenzanalyse wurde der Phasmidklon (A) identifiziert, der das aus dem V_H PCR ausgeschnittene Insert enthält (Fig. 1).

Beispiel 2:

Der Phasmidklon (A) wurde mit XbaI und HindII gespalten, die XbaI Schnittstellen mit Klenow Polymerase und dNTPs aufgefüllt und das DNA Fragment mit dem V Gen Exon isoliert. Das isolierte DNA Fragment wurde dann in einen KS+ Phasmid kloniert, aus dem durch einen PvuII Verdau der Polylinker und dem Polylinker benachbarte Bereiche entfernt worden waren. Es wurde der Klon (B) identifiziert, der das V_H Insert und die zwischen den XbaI und BamHI bzw. HindII und HindIII Schnittstellen gelegenen Bereiche des KS+ Polylinkers enthält (Fig. 2). Der Phasmid B wurde verwendet, um die V_H Gene der Antikörper I und II (V_{H1} und V_{H2}) nach Amplifikation aus der cDNA der Hybridzellen zu klonieren. Die Amplifikation der V_H Gene erfolgte nach der von R. Orlandi et al. (1989, a.a.o.) beschriebenen Methode. Der Phasmidklon B mit dem V_{H1} Gen wird als B1 und der Phasmidklon B mit dem V_{H2} Gen als B2 bezeichnet (R.M. Hudziak et al., Cell., Vol. 31, 137-146, 1982; F. Lee et al., Nature, Vol. 294, 228, 1981).

Beispiel 3:

Ein pUC 19 Plasmid, der das C_H1 Exon und das erste Hinge Exon eines humanen IgG₃ Gens enthält (EP A2-0404097; Fig. 3 ibidem: IgG₃ (F(ab')₂ 1H)), wurde mit der Restriktionsendonuklease HindIII gespalten und die Schnittstellen mit Klenow DNA Polymerase aufgefüllt. Dann wurde mit PstI partiell gespalten, das DNA Fragment mit dem C_H1 Exon und dem H_1 Exon isoliert und in einen mit PstI und HindIII gespaltenen pUC 18 Plasmid kloniert. Es wurde der Klon (C) isoliert, der 5' des Insert eine BamHI und 3' des Inserts eine HindIII Schnittstelle trägt (Fig. 3).

Beispiel 4:

Der Phasmidklon C wurde mit HindIII gespalten, die Schnittstellen mit Klenow DNA Polymerase aufgefüllt. Dann mit BamHI das Insert mit den C_H1 und H_1 Exons ausgeschnitten, isoliert und in einen KS+ Plasmid (pBluescript^R IKS+, Stratagene, LaJolla, CA, USA) kloniert. Der KS+ Plasmid war mit XbaI gespalten, die XbaI Schnittstellen mit Klenow DNA Polymerase aufgefüllt und anschließend mit BamHI nachgeschnitten worden. Es wurde der Phasmidklon (D) isoliert, der das Insert mit den C_H1 und Hinge 1 Exons in einer Orientierung enthält, bei der sich auf der 5' Seite des Inserts eine BamHI und eine HindIII Schnittstelle befinden (Fig. 4).

Beispiel 5:

Der Phasmidklon (B1) wurde mit HindIII und BamHI gespalten, das Insert mit dem V_H Gen des Antikörpers I isoliert und in den ebenfalls mit HindIII und BamHI gespaltenen Vektor (D) kloniert. Es wurde der Klon (E) isoliert, der das V_{H1} Gen, das C_H1 und das Hinge 1 Exon enthält (Fig. 5).

Beispiel 6:

Aus dem Phasmidvektor B2 wurde mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) unter Verwendung der Oligonukleotide V_H Oligol und V_H Oligoll (Tab. 1) ein DNA Fragment amplifiziert (F), welches ein um einen Linker verlängertes V_H Gen enthält und an seinem 5' Ende eine gespaltene PvuII und an seinem 3' Ende

eine BamH1 Schnittstelle trägt (Fig. 6). Dieses Fragment wurde mit BamH1 gespalten und in einen BamH1/PvuII gespaltenen KS + Vektor kloniert, bei dem vorher eine der beiden internen PvuII Schnittstellen durch Asp718/PvuII Spaltung, Auffüllen der Schnittstellen und Religation zerstört worden war.

5

Tab. 1:V_HOligoI:

10

PvuII

15

5' CT.GCC.GCC.CCC.GCA.GCC.GCA.
 GCC.GCA.GGC.GGC.CAG.GTC.CAA.CTG.CAG.GAG.
 AGC.GGT.CCA.GG 3'

20

V_HOligoII:

25

BamH1

5' CGG.GGA.TCC.TAT.AAA.TCT.CTG.GC 3'

30

Es wurde der Phasmidklon (F) isoliert, der das amplifizierte Fragment enthält (Fig. 6).

Beispiel 7:

35 Die Oligonukleotide OligoIII und IV (Tab. 2) wurden miteinander hybridisiert und das entstehende DNA Fragment in den mit PvuII gespaltenen Phasmidklon (F) ligiert (Fig. 7). Es wurde der Phasmidklon (G) isoliert, der ein Fusionsexon aus einem Hinge Exon, einem Oligonukleotidlinker und dem V_H2 Gen enthält.

40

45

50

55

Tab. 2:

5 Oligo III:

5' Hind III Sph I
 GCG.GAA.GCT.TCG.GGC.ATG.CTA.ATC.TTC.TCT.CTT.GCA.GAG.
 10 CCC.AAA.TCT.TGT.GAC.ACA.CCT.CCC.CCG.TGC.CCA.AGG.TGC.
 CCA.GGA.CAG
 3'

15

Oligo IV:

20 5'
 CTG.TCC.TGG.GCA.CCT.TGG.GCA.CGG.GGG.AGG.TGT.GTC.ACA.
 AGA.TTT.GGG.CTC.TGC.AAG.AGA.GAA.GAT.TAG.CAT.GCC.CGA.
 25 AGC.TTC.CGC Sph I
 Hind III 3'

30

Beispiel 8:

Aus dem Plasmidklon 54.1.24, der ein humanes IgG₃ C-Gen enthält (EP-A2-0404097, Fig. 2) wurde mit
 den Oligonukleotiden V und VI (Tab. 3) das C_H3 Exon und der 3' NT Bereich des IgG₃ Gens herausamplifi-
 35 ziert und in die BamH1 und EcoRI Schnittstellen eines pUC19 Plasmids kloniert (Fig. 8). Es wurde der
 Plasmidklon (H) isoliert, der das C_H3 Exon des IgG₃ Gens enthält.

40

45

50

55

Tab. 3:

Oligo V:

5' BamH1 3'
CC.TCT.GCC.CTG GGA TCC.ACC.GCT.GTG.CC

Oligo VI:

5' EcoRI
AAC.CAT.CAC.GAA.TTC.ACA.GGG.GCC 3'

Beispiel 9:

Der Plasmidklon (H) wurde mit BamH1 und EcoRI gespalten und das DNA Fragment, welches das C_{H3} 30 Exon trägt, in den mit BamH1 und EcoRI gespaltenen Phasmidklon (G) kloniert (Fig. 9). Es wurde der Phasmidklon (I) isoliert, der das Hinge/ Linker/V_{H2} Fusionsexon und das C_{H3} Exon enthält.

Beispiel 10:

35 Die Phasmidklone (E) und (I) wurden mit HindIII und SphI gespalten. Das Insert des Klon (E) wurde in die HindIII und SphI Schnittstellen des Phasmidklons (I) kloniert. Es wurde der Phasmidklon (K) isoliert, der ein Ig schwere Ketten Fusionsgen enthält, welches aus Signalexon, V_H1 Exon, C_H1 Exon, Hingel Exon, Hinge/ Linker/V_H2 MAKII Fusionseson und C_H3 Exon besteht (Fig. 10).

40 Beispiel 11:

Aus dem Phasmidklon (K) wurde das HindIII-EcoRI Fragment mit dem Fusionsgen ausgeschnitten und in einen pAB Stop Expressionsvektor kloniert (Fig. 19, (pAB Stop ist ein Derivat des pAB 3 Vektors (G. Zettlmeißl et al., BIM, 82, 26-34, (1988), bei dem das AT III Gen durch einen Polylinker ersetzt wurde), dessen BamHI Fragment durch einen EcoRI Linker ersetzt worden war. Es wurde der Klon (L) isoliert, der das Fusionsgen enthält (Fig. 11). Der Klon (L) wurde aufgebaut und für Transfektionen in Säugerzellen verwendet.

Beispiel 12:

Konstruktion leichte Kette Gen:
Der Phasmidklon (B) wurde mit HindIII und BamHI gespalten und das V_H Insert durch das aus dem Vektor V_K PCR (R. Orlandi et al. 1989, a.a.o.) isolierte V_K Insert ersetzt. Es wurde der Phasmidklon (M) isoliert, der ein Signalexon und ein V_K Exon trägt (Fig. 12). Der Phasmidklon wurde verwendet, um die amplifizierten V_K Gene der MAK I und II zu klonieren. Der Vektor M mit dem V_K1 Gen wurde als M1 und der Vektor M mit dem V_K2 Gen wurde als M2 bezeichnet.

Beispiel 13:

Das humane C_K Gen (Hieter et al., J. of Biol. Chem., 257: 1516-1522, 1982) wurde als EcoRI Fragment isoliert und in die SmaI Schnittstelle eines pUC 19 kloniert. Es wurde der Klon (N) isoliert, der das humane C_K Gen enthält (Fig. 13).

5 Beispiel 14:

Der Klon (N) wurde mit EcoRI und HindIII gespalten, das C_K Insert isoliert und in einen EcoRI/HindIII gespaltenen KS + Vektor kloniert. Es wurde der Phasmidklon (O) isoliert, der das C_K Insert enthält (Fig. 14).

10 Beispiel 15:

Der Klon (O) wurde mit BamH1 gespalten, das C_K Insert isoliert und in einen BamH1 gespaltenen pAB Stop Vektor kloniert. Es wurde der Klon (P) isoliert, der das C_K Insert in einer Orientierung enthält, in der das 5' Ende des C_K Gens in der Nähe der HindIII Schnittstelle des pAB Stop Vektors liegt (Fig. 15).

15 Beispiel 16:

Der Klon (P) wurde partiell mit BamH1 gespalten, die Schnittstellen mit Klenow DNA Polymerase aufgefüllt und religiert. Es wurde der Klon (Q) identifiziert, bei dem die BamH1 Schnittstelle 3' des C_K Gens zerstört ist (Fig. 16).

Beispiel 17:

Der Phasmidklon (M1) mit dem V_K1 Gen wurde mit HindIII und BamH1 gespalten. Das Insert mit dem V_K Gen wurde isoliert und in die HindIII und BamH1 Schnittstelle des Expressionsvektors (Q) ligiert. Es wurde der Klon (R) identifiziert, der ein intaktes Kappa leichte Ketten Gen mit Spezifität des Antikörpers I enthält (Fig. 17).

Beispiel 18:

Der Plasmidklon (H) mit den C_H3 Exon des humanen IgG₃ Gens wurde mit EcoRI und HindIII gespalten, das C_H3 Insert isoliert und in einen EcoRI/HindIII gespaltenen KS + Vektor kloniert. Es wurde der Phasmidklon (S) isoliert, der das C_H3 Insert enthält (Fig. 18).

35 Beispiel 19:

Der Klon (S) wurde mit BamH1 gespalten, das C_H3 Insert isoliert und in einen BamH1 gespaltenen pAB Stop Vektor (Fig. 19) kloniert. Es wurde der Klon (T) isoliert, der das C_H3 Insert in einer Orientierung enthält, in der das 5' Ende des C_H3 Exons in der Nähe der HindIII Schnittstelle des pAB Stop Vektors liegt (Fig. 20).

Beispiel 20:

Der Klon T wurde partiell mit BamH1 gespalten, die Schnittstelle mit Klenow DNA Polymerase aufgefüllt und religiert. Es wurde der Klon (U) identifiziert, bei dem die BamH1 Schnittstelle 3' des C_H3 Gens zerstört ist (Fig. 21).

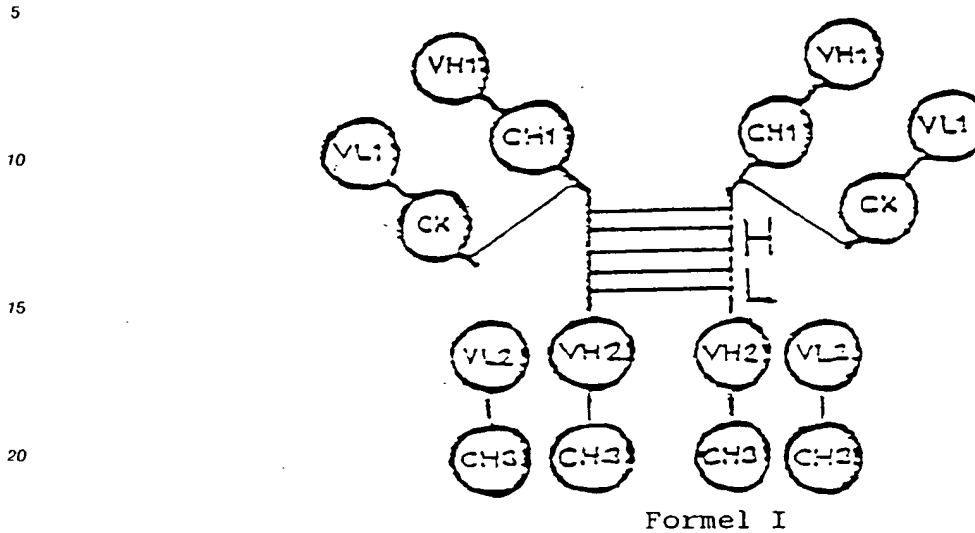
Beispiel 21:

Der Phasmidklon (M2) mit dem V_K2 Gen wurde mit HindIII und BamH1 gespalten. Das Insert mit dem V_K Gen wurde isoliert und in die HindIII und BamH1 Schnittstellen des Expressionsvektors (U) ligiert. Es wurde der Klon (V) identifiziert, der ein intaktes leichte Ketten Gen mit Spezifität des Antikörpers II und ein C_H3 Exon als konstante Region enthält (Fig. 22).

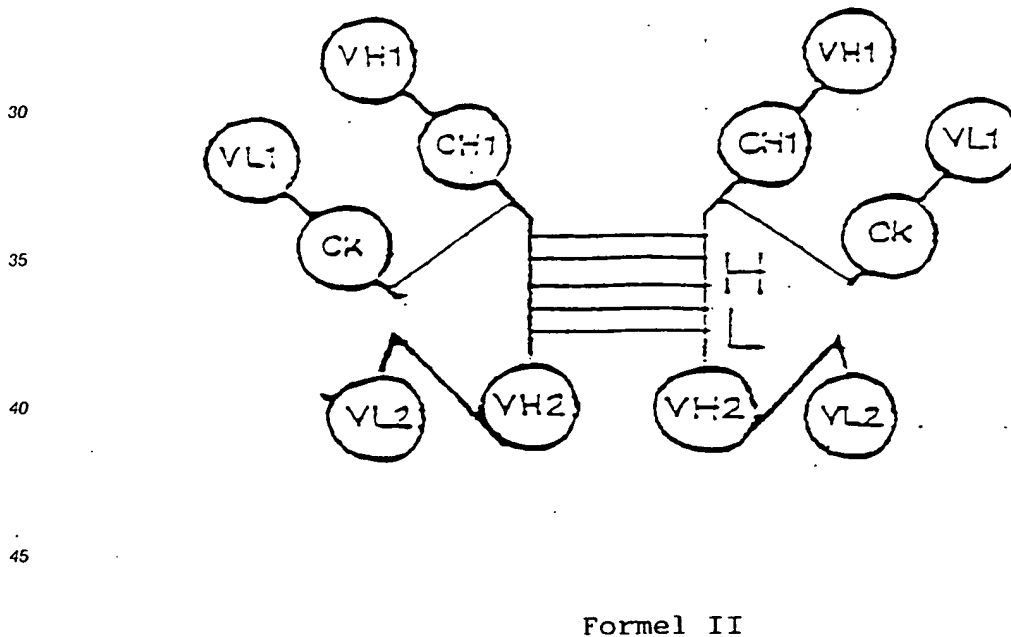
Die Expressionsplasmide L, R und V wurden zusammen mit geeigneter, Selektionsmarker-tragenden Phasmiden, wie z.B. pRMH140 (Fig. 23) (R.M. Hudziak et al., 1982, a.a.o.) oder pSV2dhfr (Fig. 24) (F. Lee et al., 1981, a.a.o.), in Säugerzellen kotransfiziert (30), durch Selektionsdruck Transfektomaklone selektiert und durch Testung der Überstände mittels geeigneter Assays solche Transfektomaklone identifiziert, die bivalente tetraspezifische Rezeptormoleküle sezernieren.

Patentansprüche

1. Bispezifische, tetravalente Rezeptoren nach Formel I



25 oder Formel II



50 dadurch gekennzeichnet, daß nur die zusammengehörigen V_L und V_H -Paarungen gebildet werden und die C_H1 Domänen mit den V_H2 Domänen über 1 bis 10 Hinge-Regionen H und einen geeigneten Peptidlinker L verbunden sind, wobei die Disulfidbrücken (dünne Striche) im Bereich der Hinge-Regionen die Dimerisierung der bivalenten Halbmoleküle bewirken.

55 2. Rezeptoren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumorassoziierte Antigene gerichtet ist.

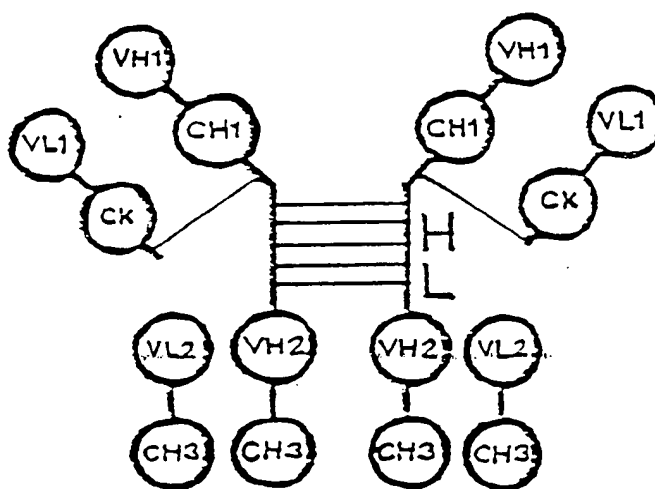
3. Rezeptoren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität katalytische oder enzymati-

sche Aktivität besitzt.

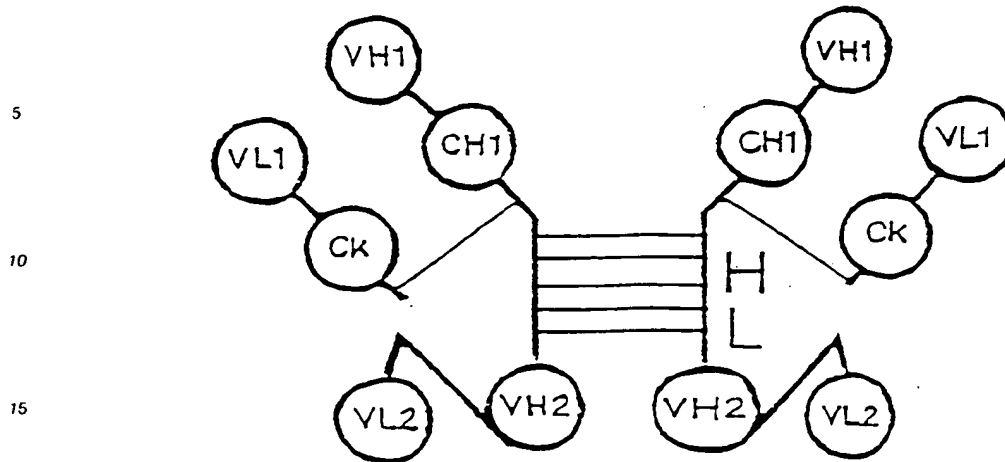
4. Rezeptoren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumorassoziierte Antigene gerichtet ist und die andere Spezifität katalytische oder enzymatische Aktivität besitzt.
5. Rezeptoren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumorassoziierte Antigene gerichtet ist und eine andere Spezifität gegen ein Komplexon gerichtet ist.
6. Rezeptoren nach Anspruch 1, 2, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität von den monoklonalen Antikörpern mit den variablen Regionen gemäß Tab. 2, 3, 4 oder 5 aus EP-A2-0 404 097 stammt.
7. Rezeptoren nach Anspruch 1 bis Anspruch 6 als Arzneimittel.
8. Verfahren zur Herstellung von Rezeptoren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die für die schweren Ketten-Antikörperteile kodierenden DNA-Fragmente mittels Linker verbunden und in einem Expressionssystem zusammen mit den Genen für die leichten Ketten exprimiert werden.
9. Bispezifische, tetravalente Rezeptoren nach Formel I, bei denen die C_H3 Domänen durch humane C_H1 Domänen ersetzt sind.

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : GR, ES

1. Verfahren zur Herstellung von bispezifischen, tetravalenten Rezeptoren nach Formel I



oder Formel II



dadurch gekennzeichnet, daß nur die zusammengehörigen V_L und V_H -Paarungen gebildet werden und die C_H1 Domänen mit den V_H2 Domänen über 1 bis 10 Hinge-Regionen H und einen geeigneten Peptidlinker L verbunden werden, wobei die Disulfidbrücken (dünne Striche) im Bereich der Hinge-Regionen die Dimerisierung der bivalenten Halbmoleküle bewirken.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumorassoziierte Antigene gerichtet ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität katalytische oder enzymatische Aktivität besitzt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumorassoziierte Antigene und die andere Spezifität katalytische oder enzymatische Aktivität besitzt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumorassoziierte Antigene gerichtet ist und eine andere Spezifität gegen ein Komplexon gerichtet ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität von den monoklonalen Antikörpern mit den variablen Regionen gemäß Tab. 2, 3, 4 oder 5 aus EP-A2-0 404 097 stammt.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis Anspruch 6 zur Verwendung als Arzneimittel.
8. Verfahren zur Herstellung von Rezeptoren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die für die schweren Ketten-Antikörperteile kodierenden DNA-Fragmente mittels Linker verbunden und in einem Expressionssystem zusammen mit den Genen für die leichten Ketten exprimiert werden.
9. Verfahren zur Herstellung von bispezifischen, tetravalenten Rezeptoren nach Formel 1, bei denen die C_H3 Domänen durch humane C_H1 Domänen ersetzt werden.

Fig.1

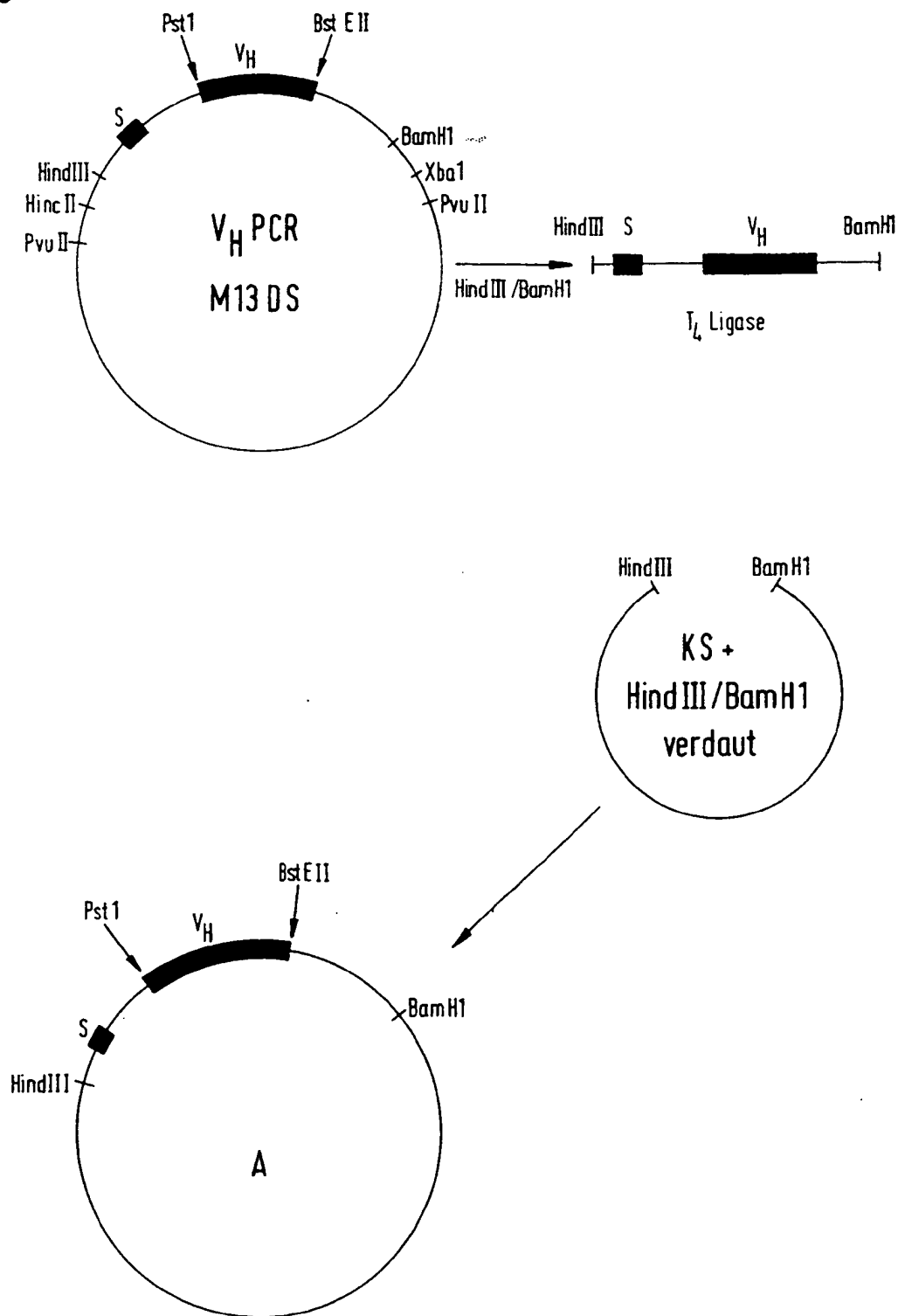


Fig.2

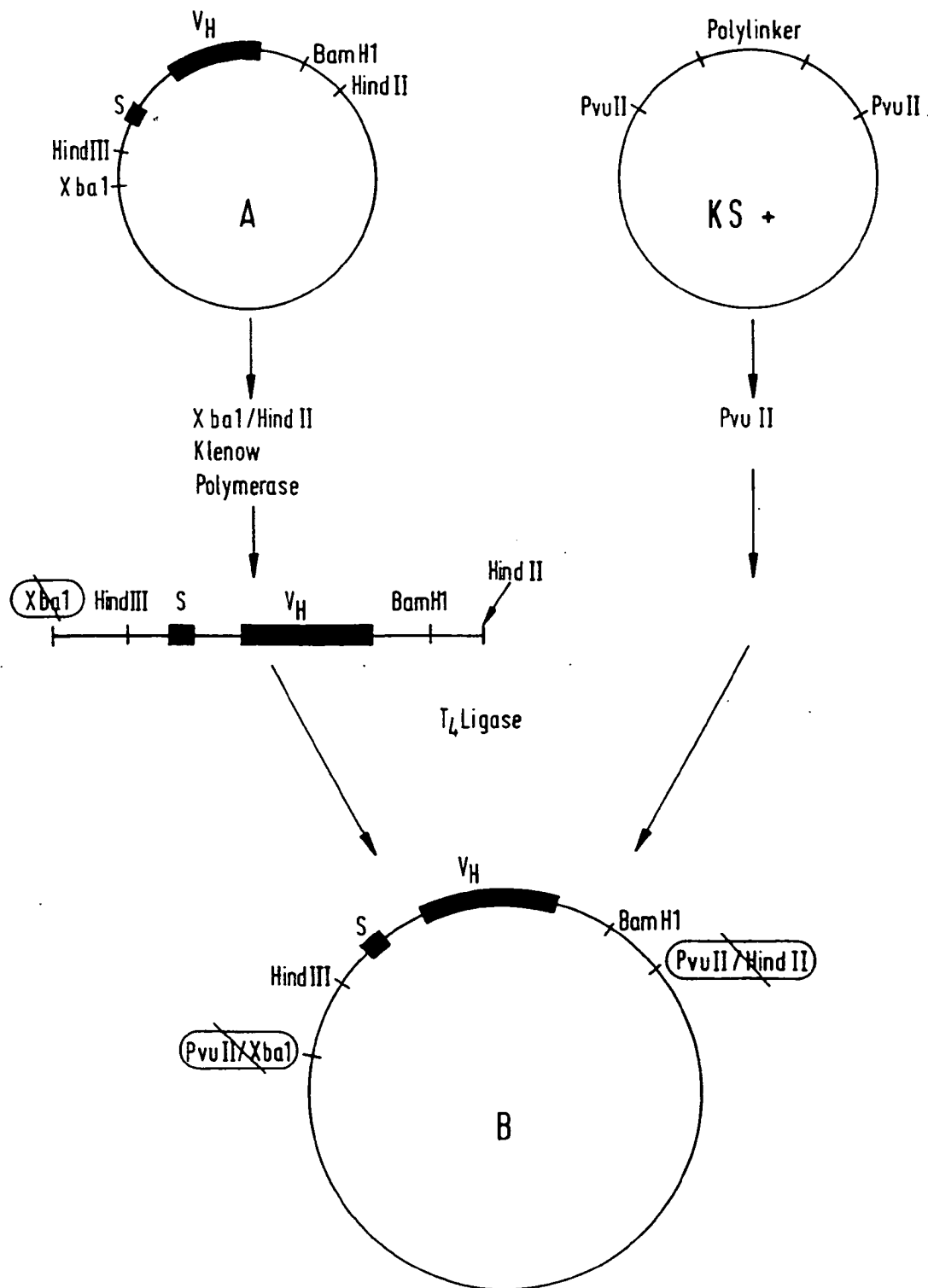


Fig. 3

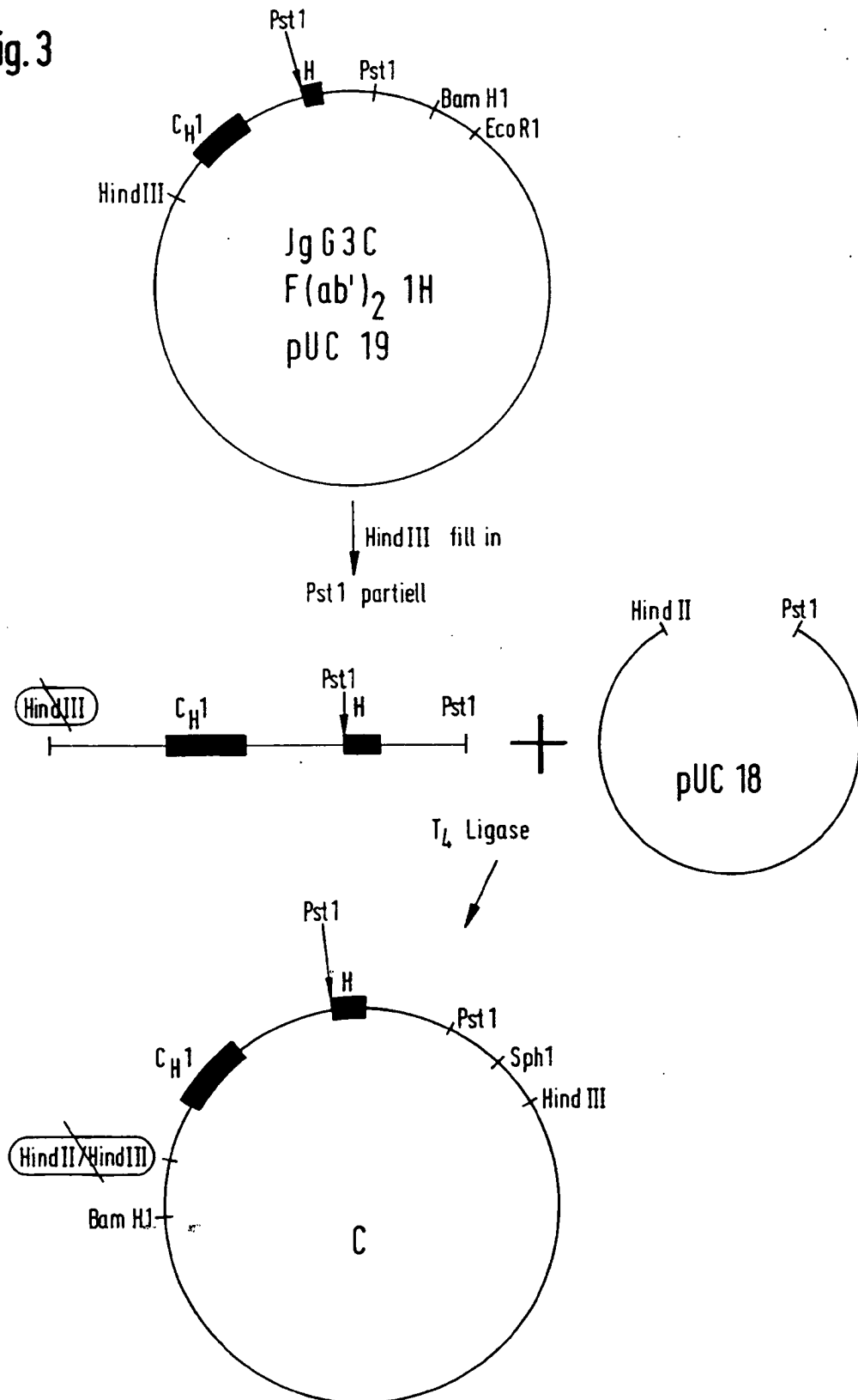


Fig.4

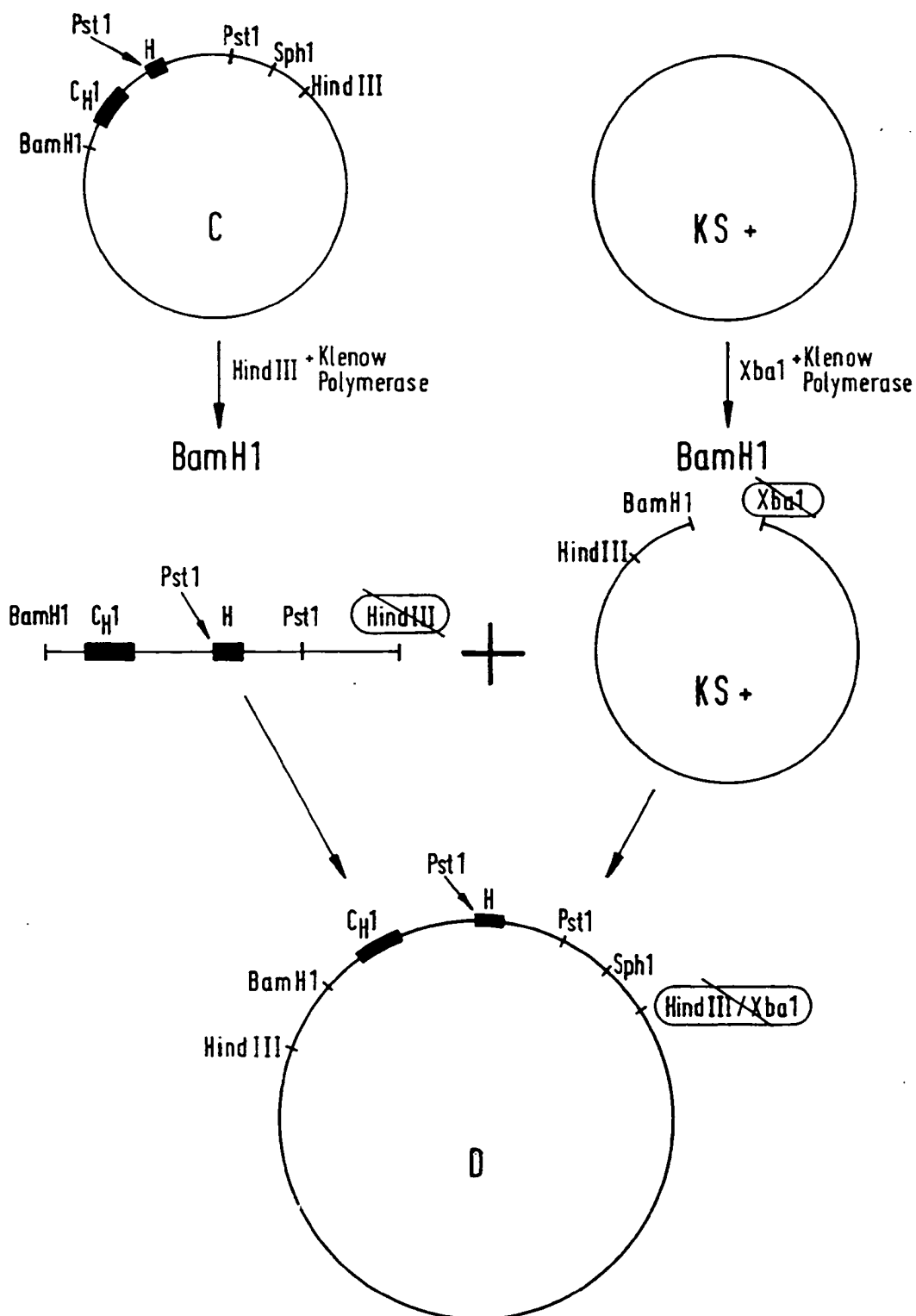


Fig. 5

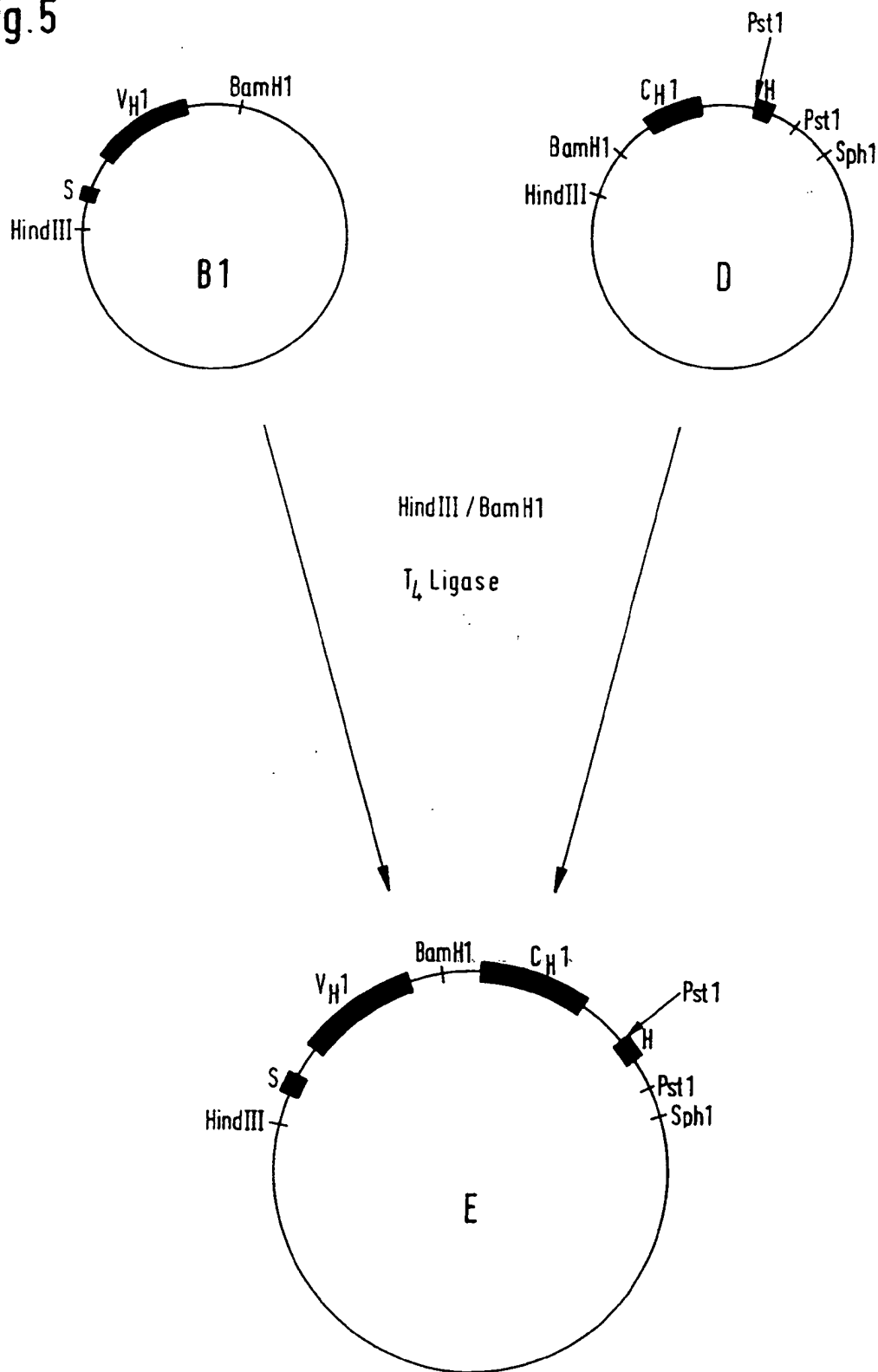


Fig. 6

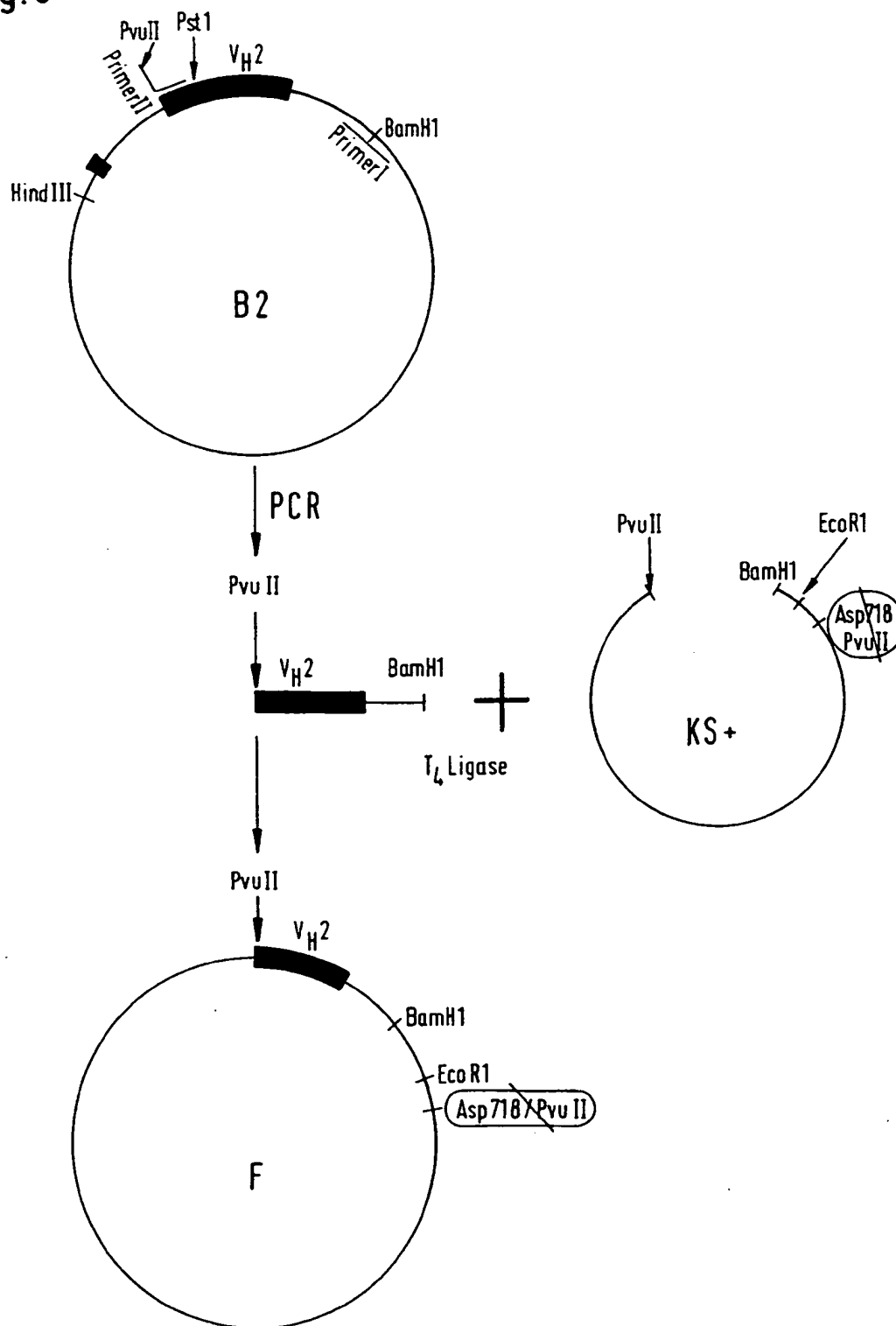


Fig.7

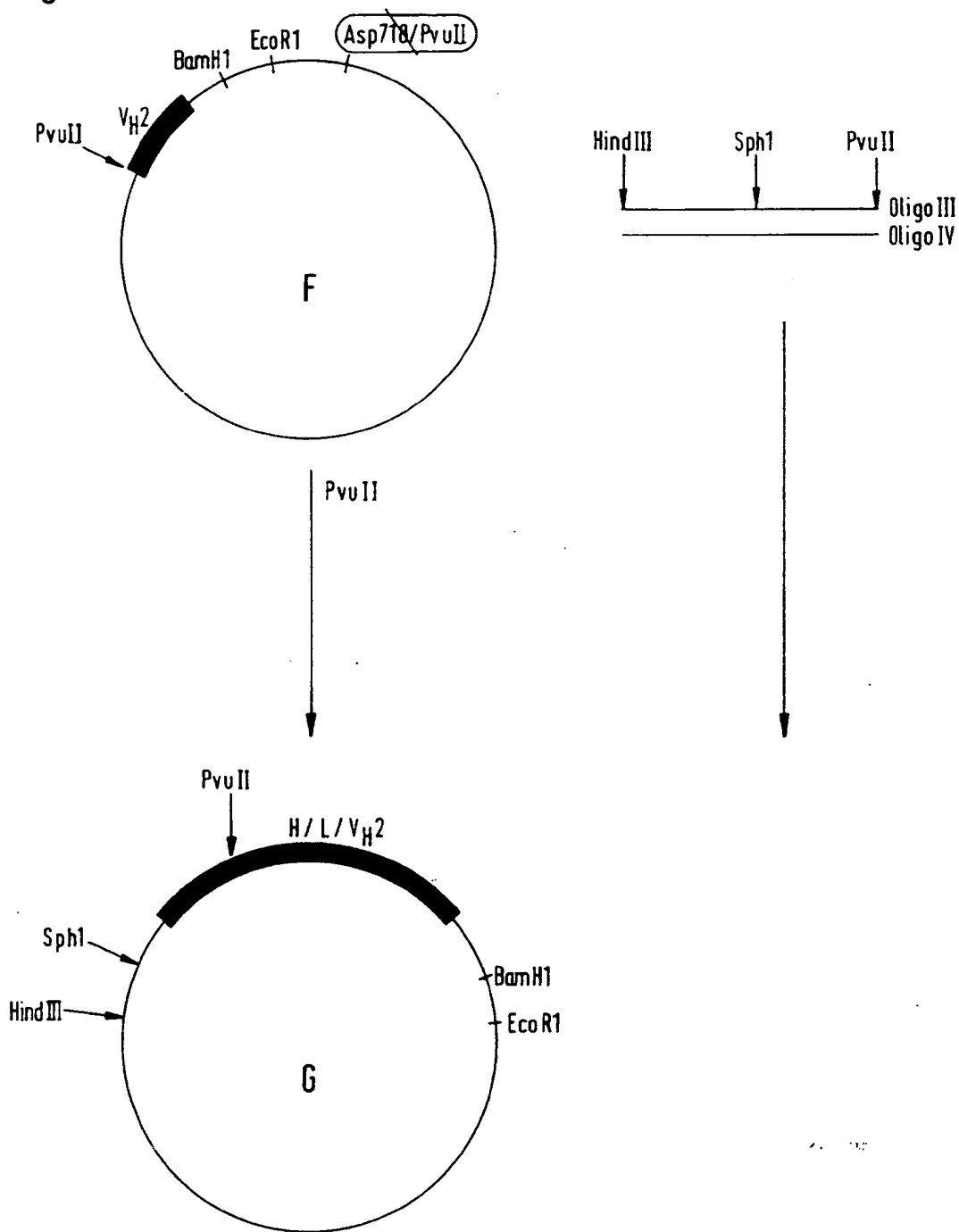


Fig.8

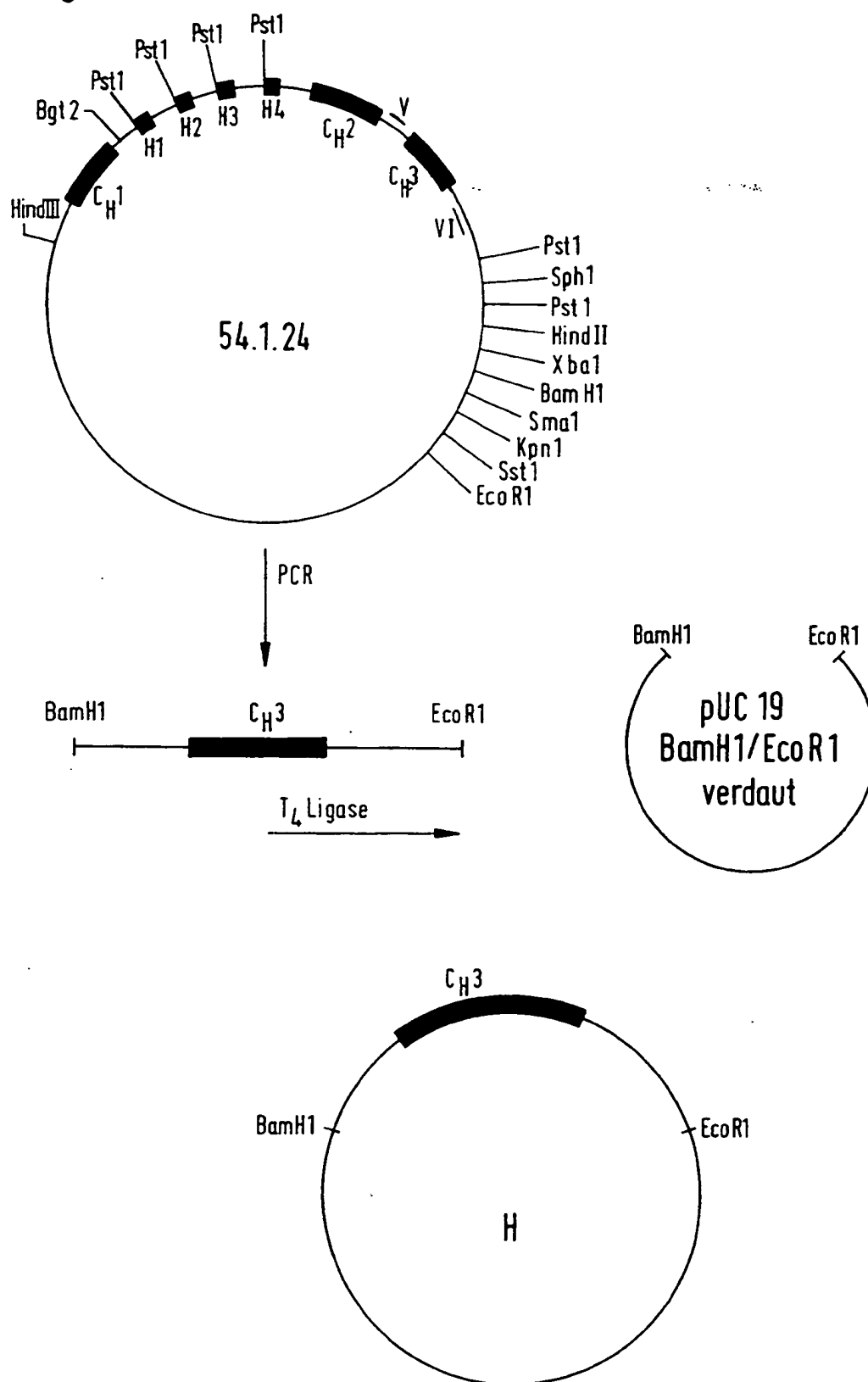


Fig.9

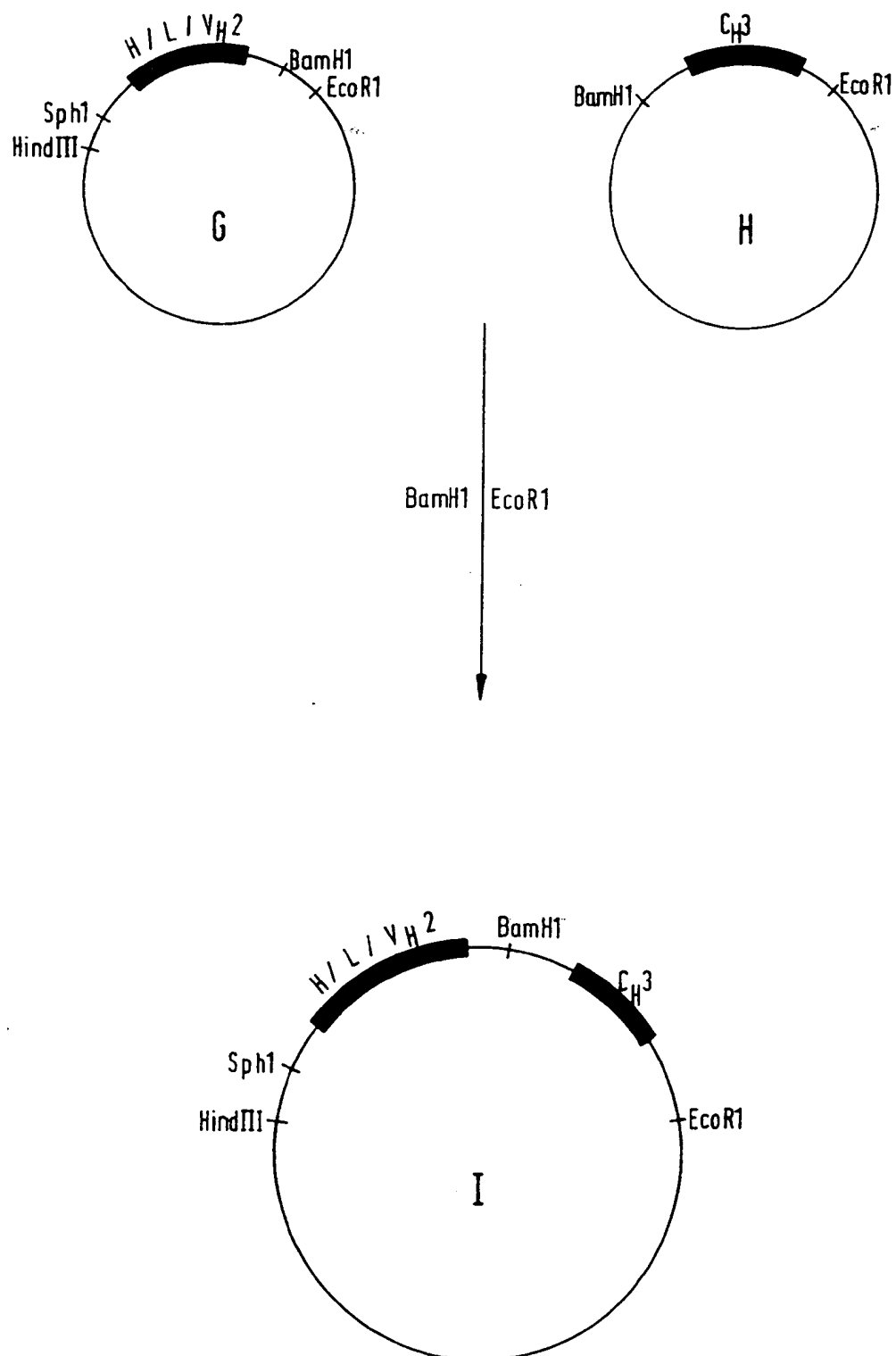


Fig.10

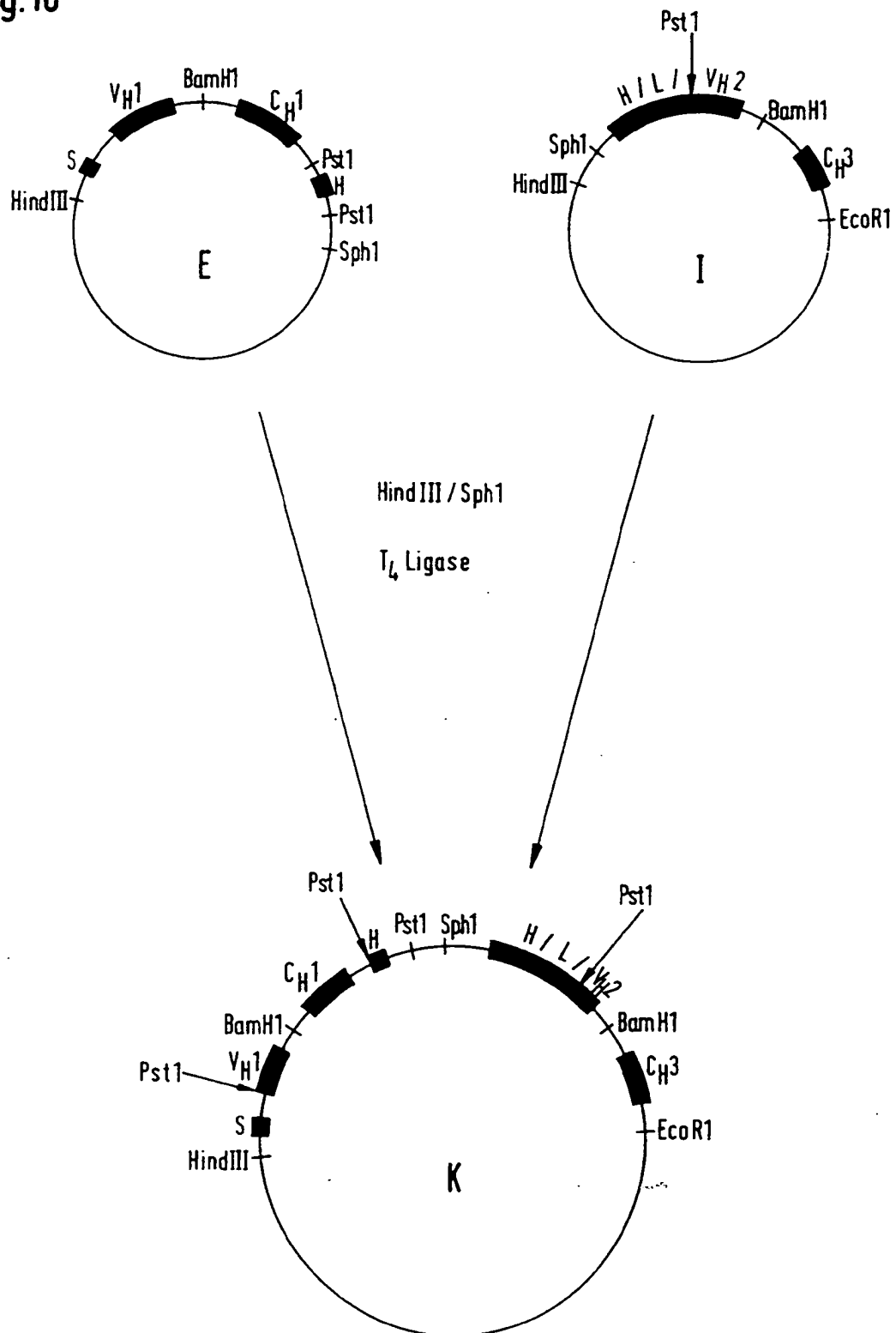


Fig.11

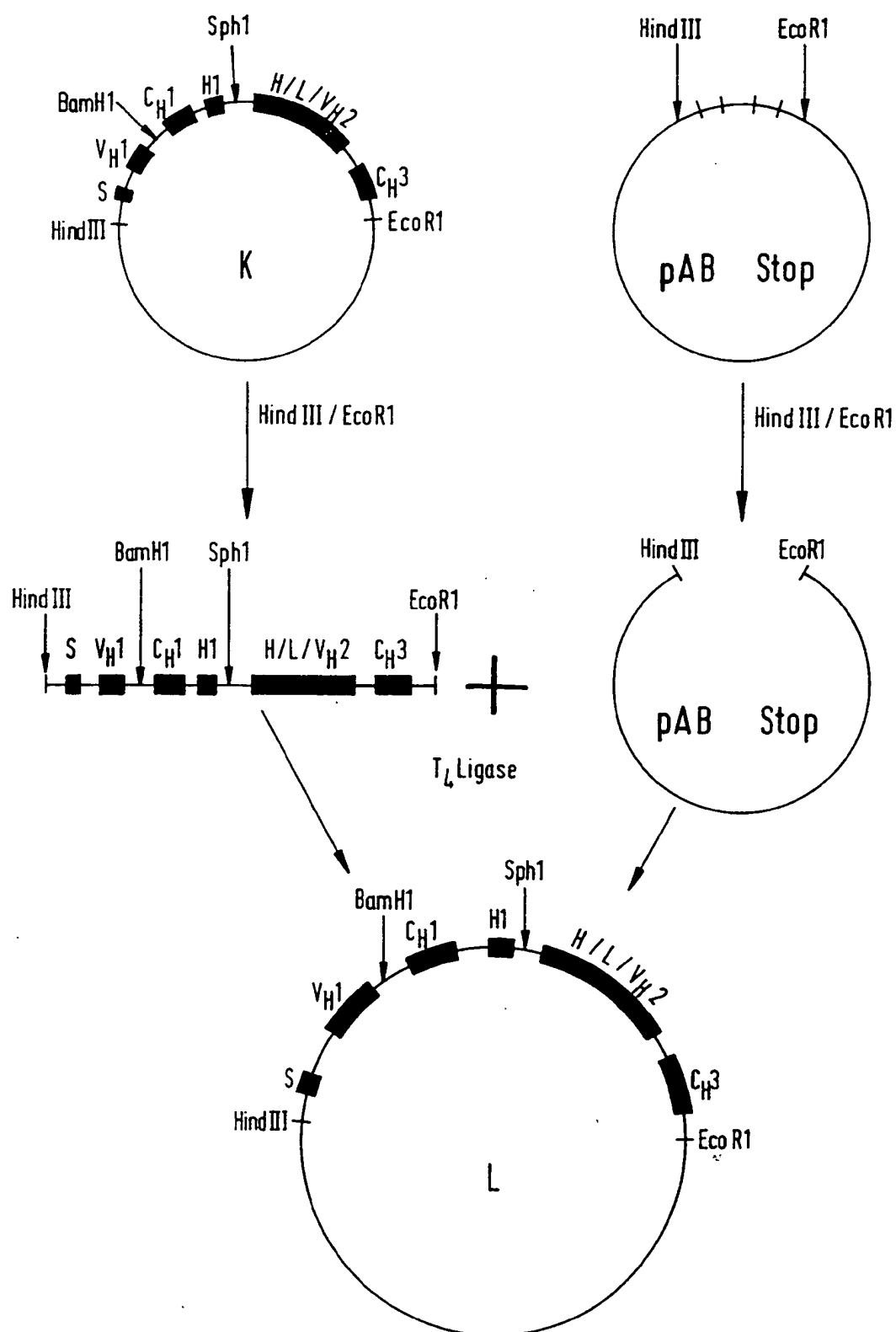


Fig.12

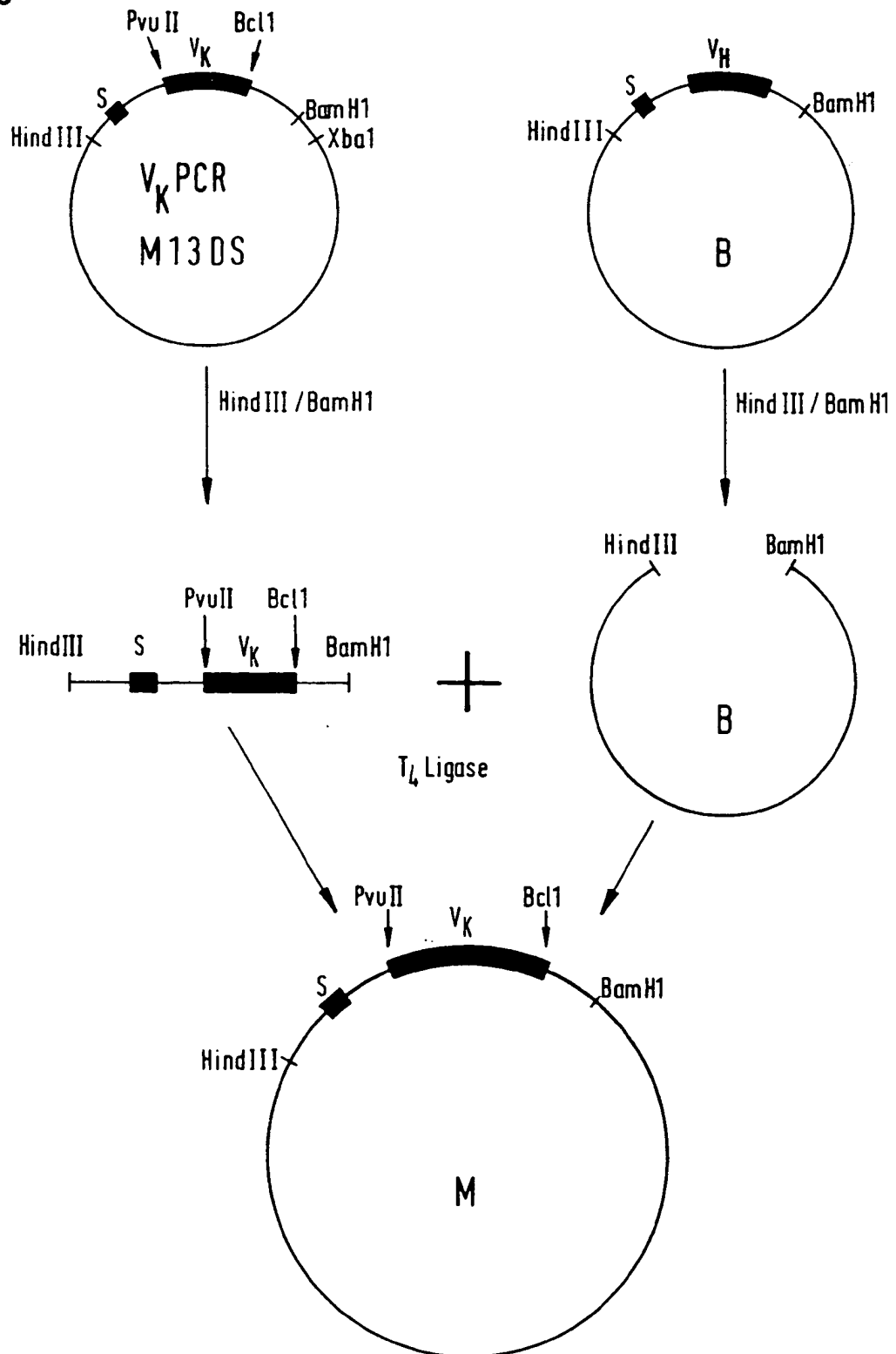


Fig.13

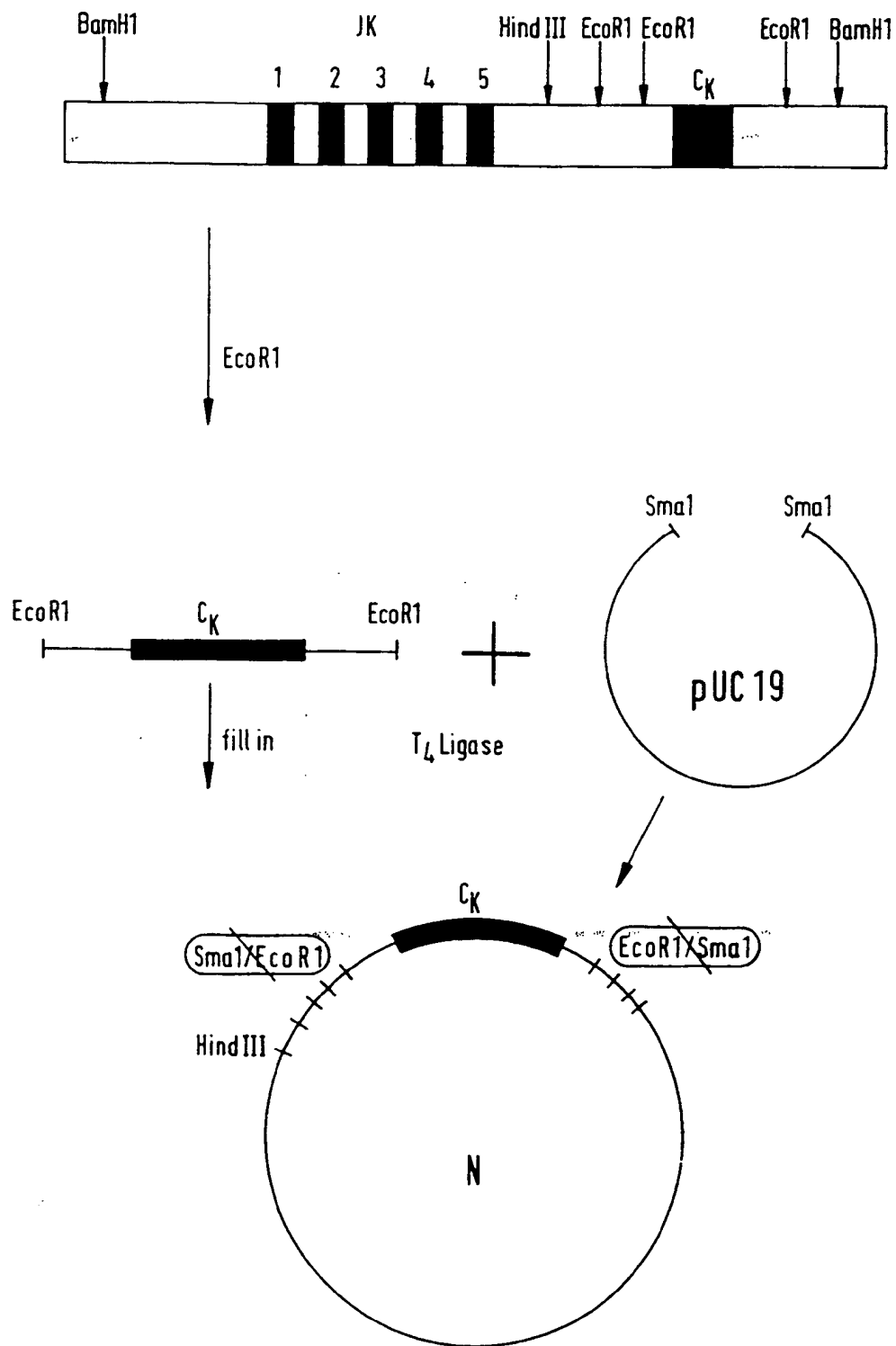


Fig. 14

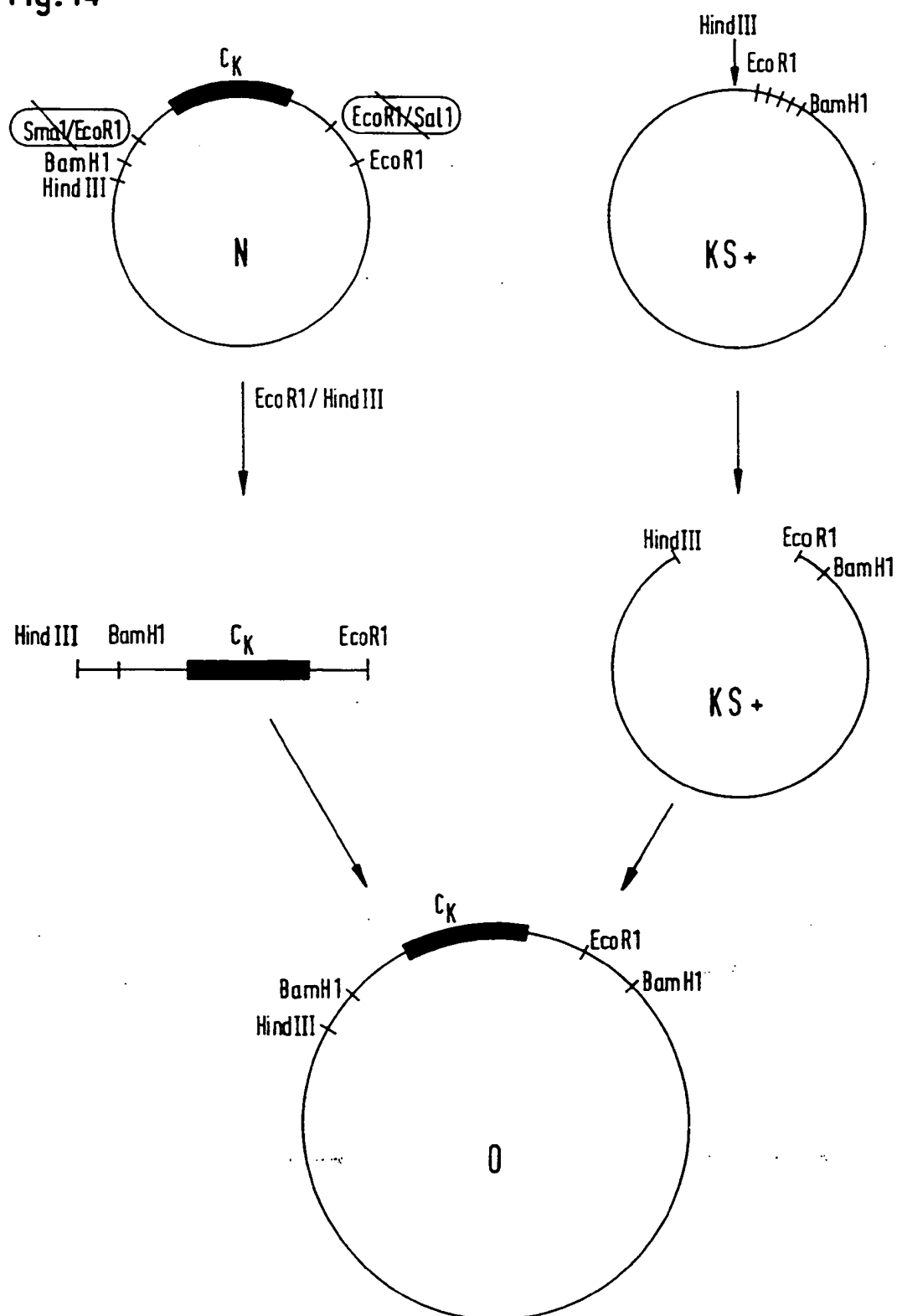


Fig.15

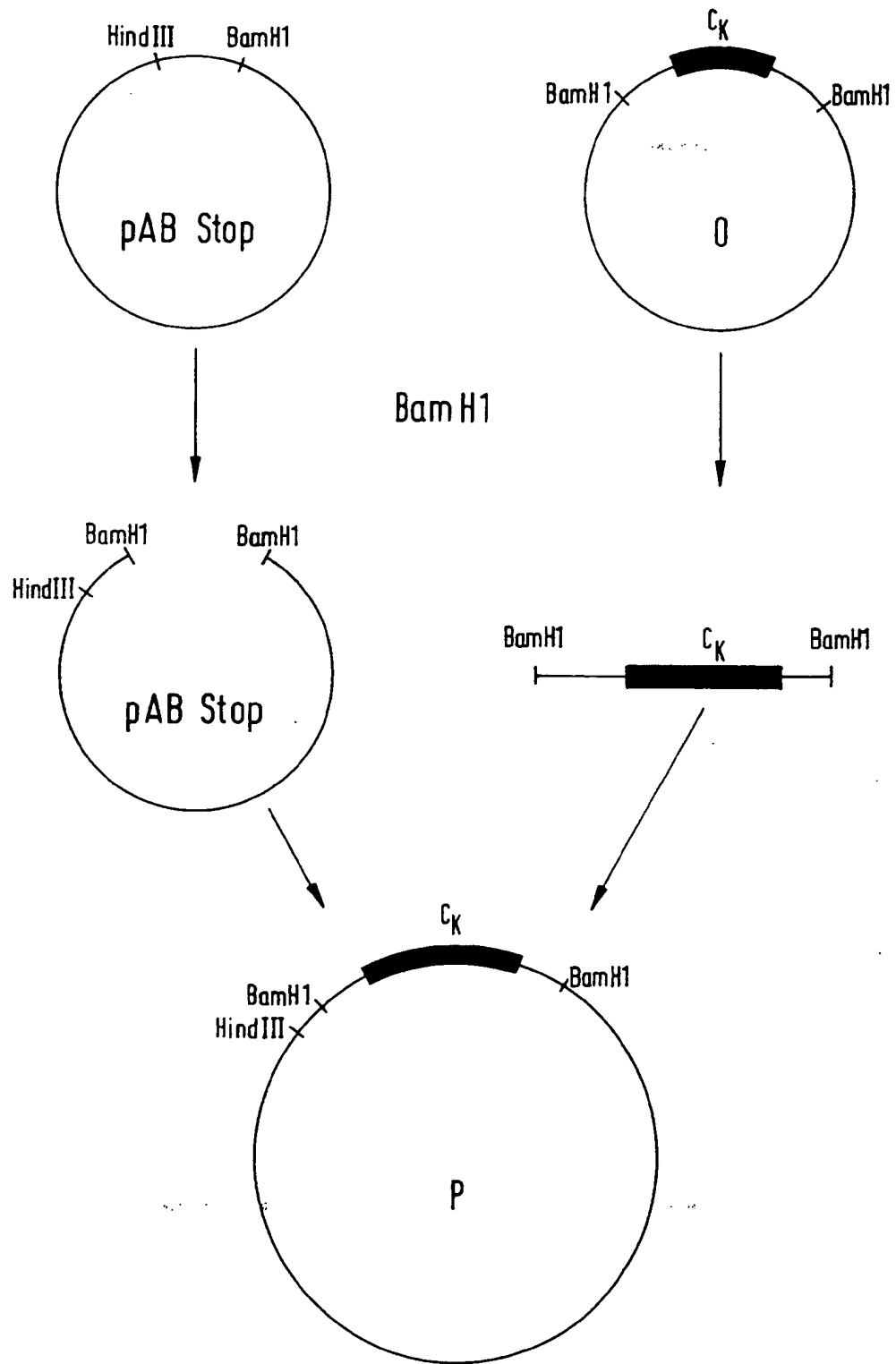


Fig.16

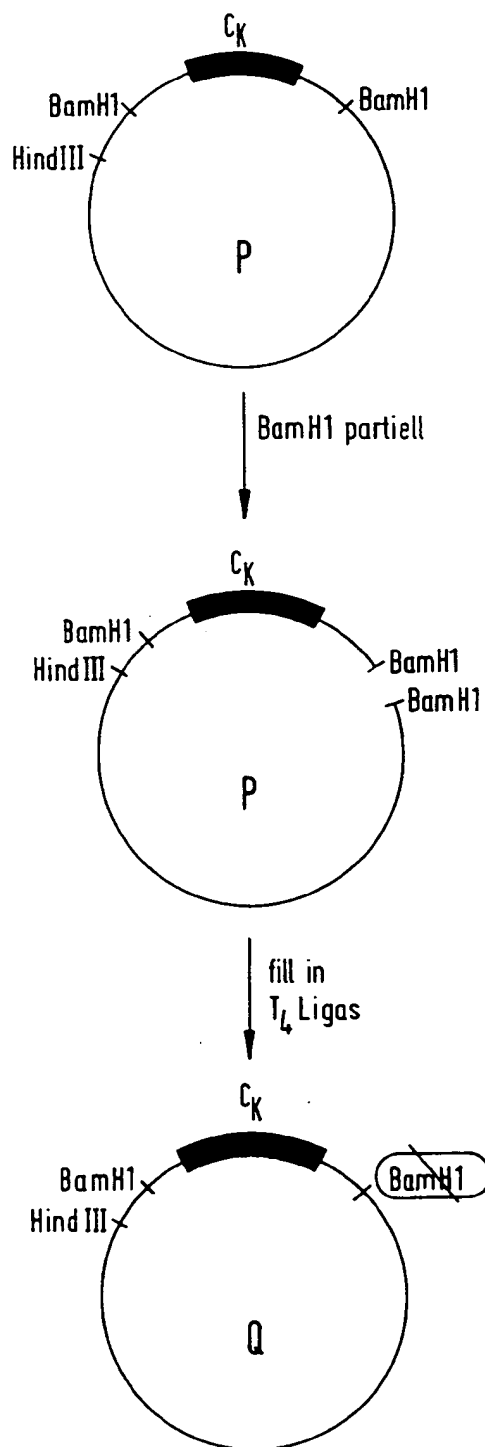


Fig.17

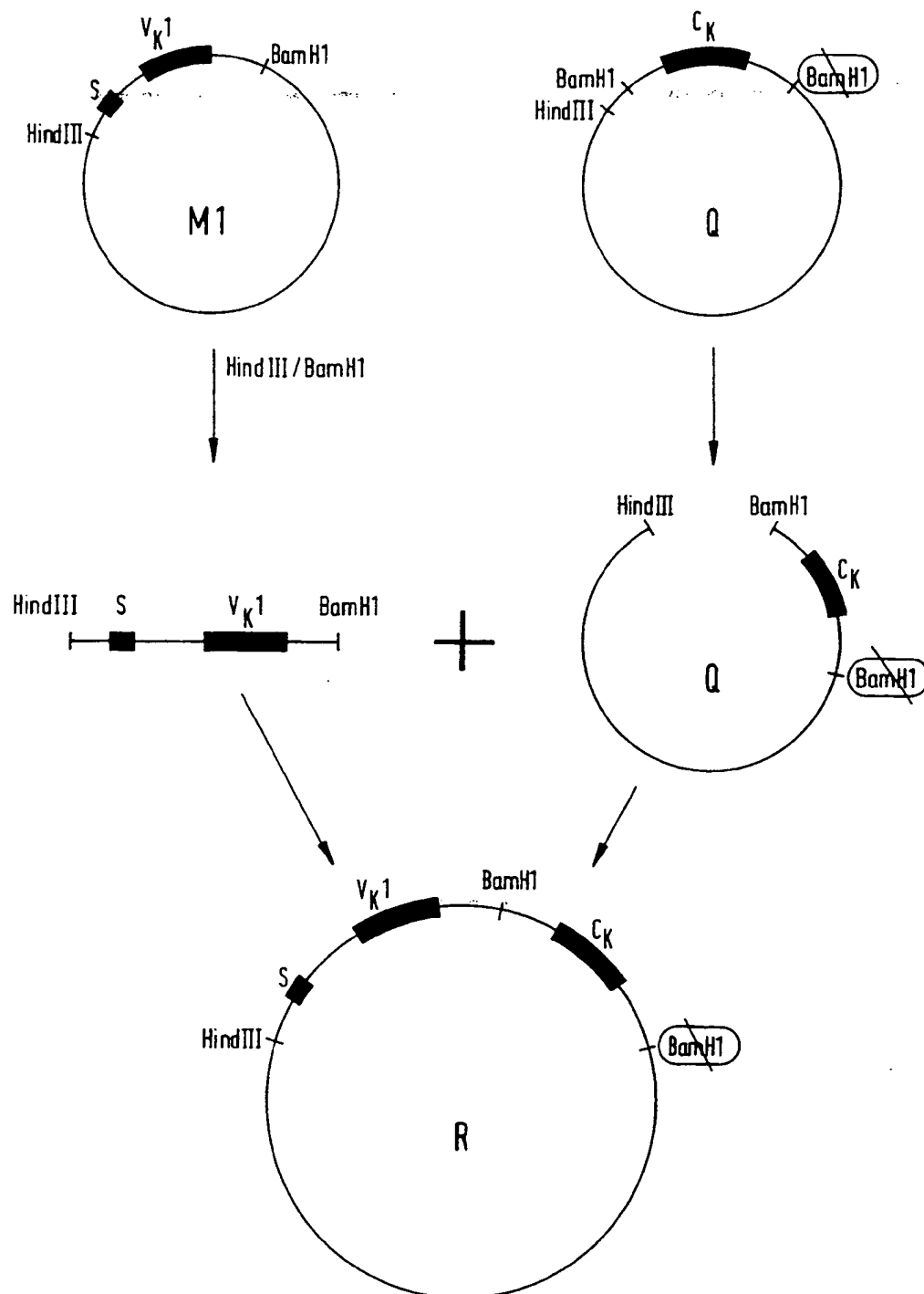


Fig.18

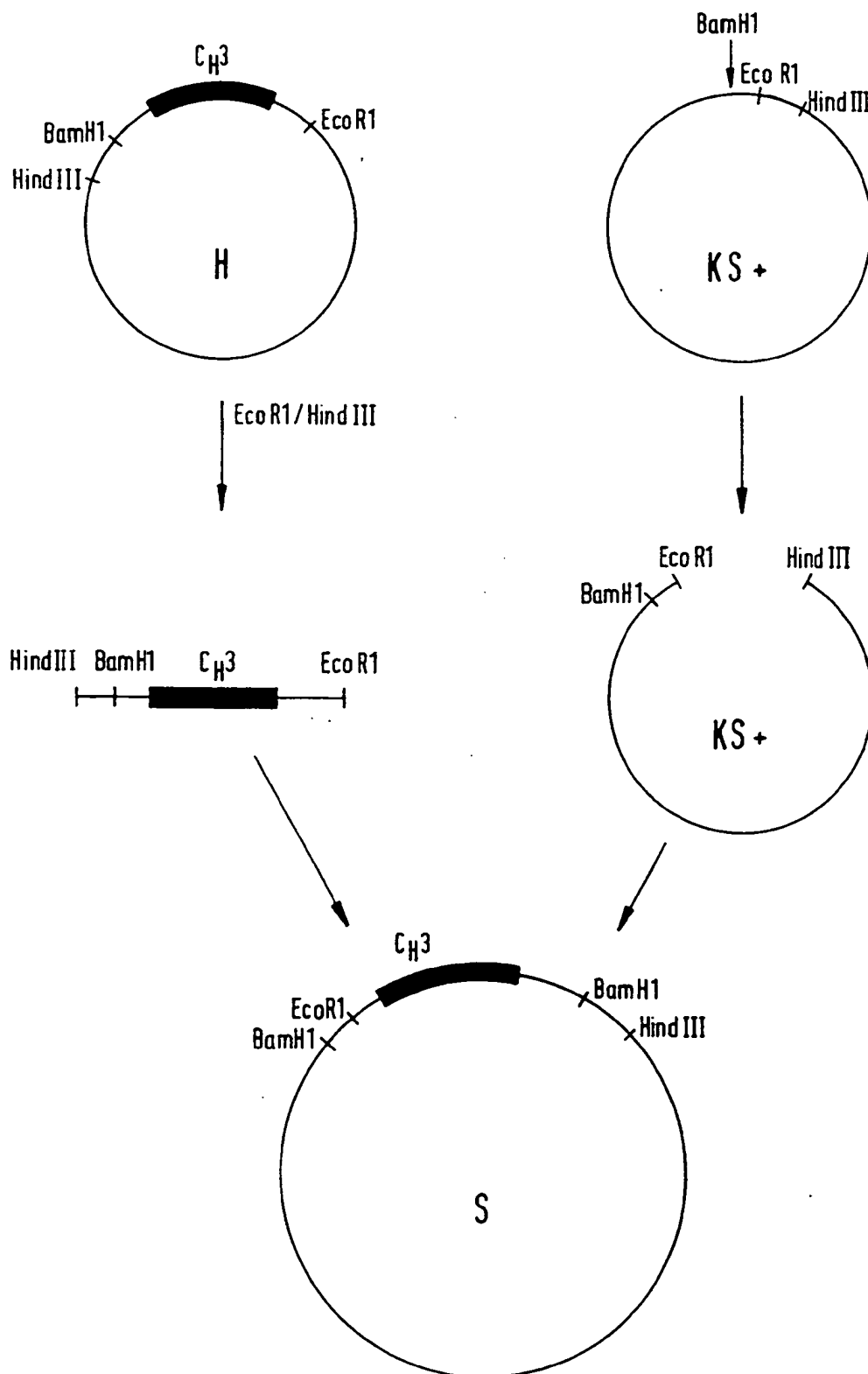


Fig.19

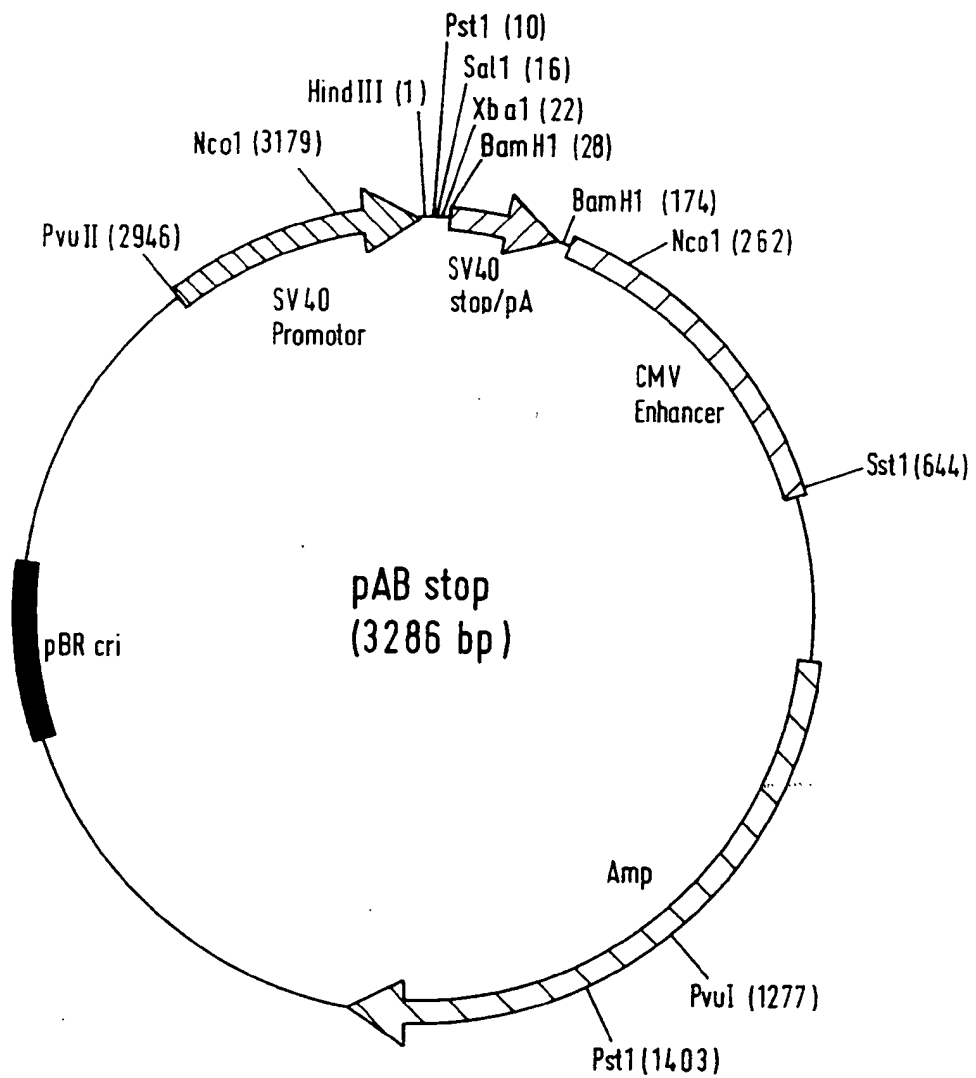


Fig.20

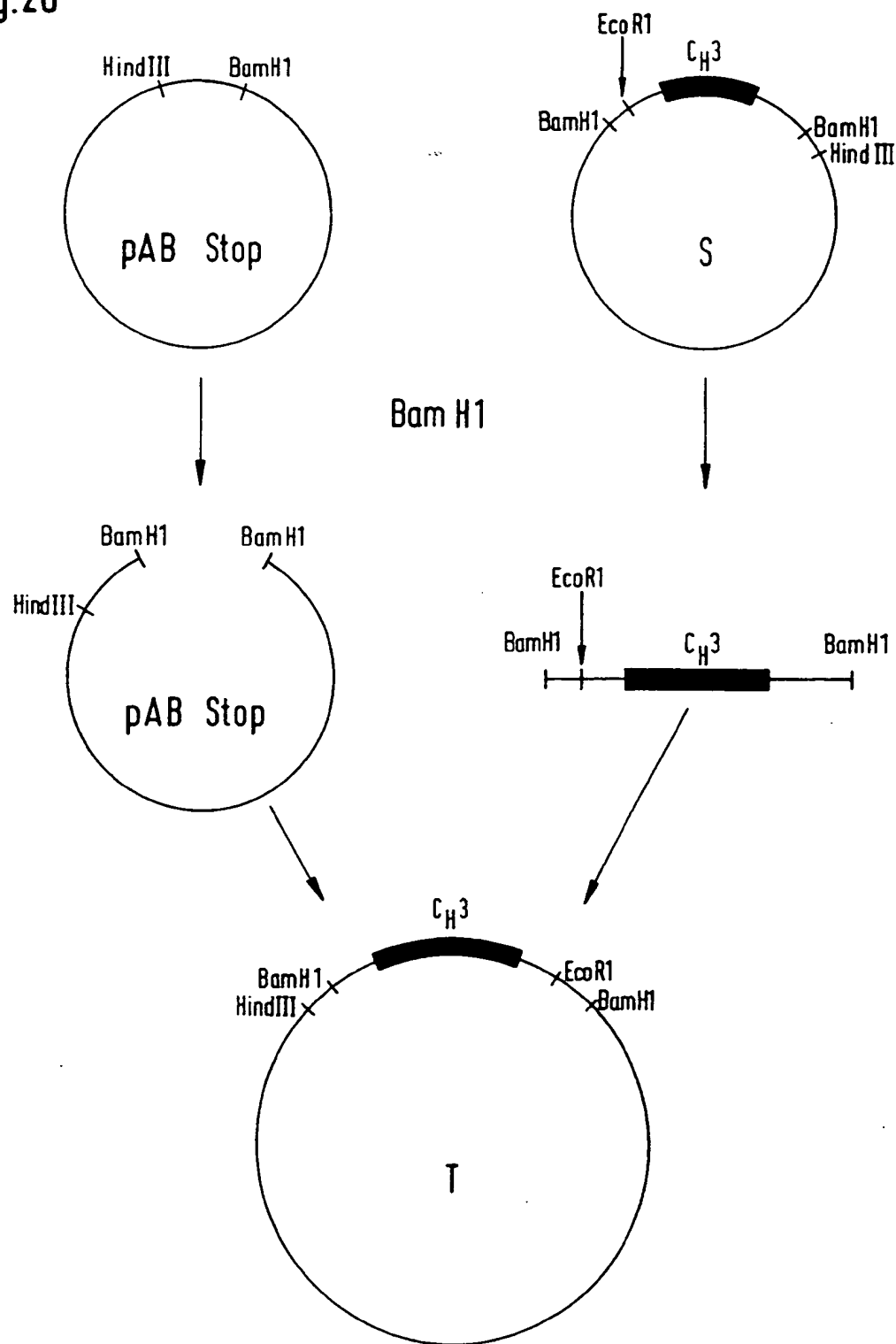


Fig. 21

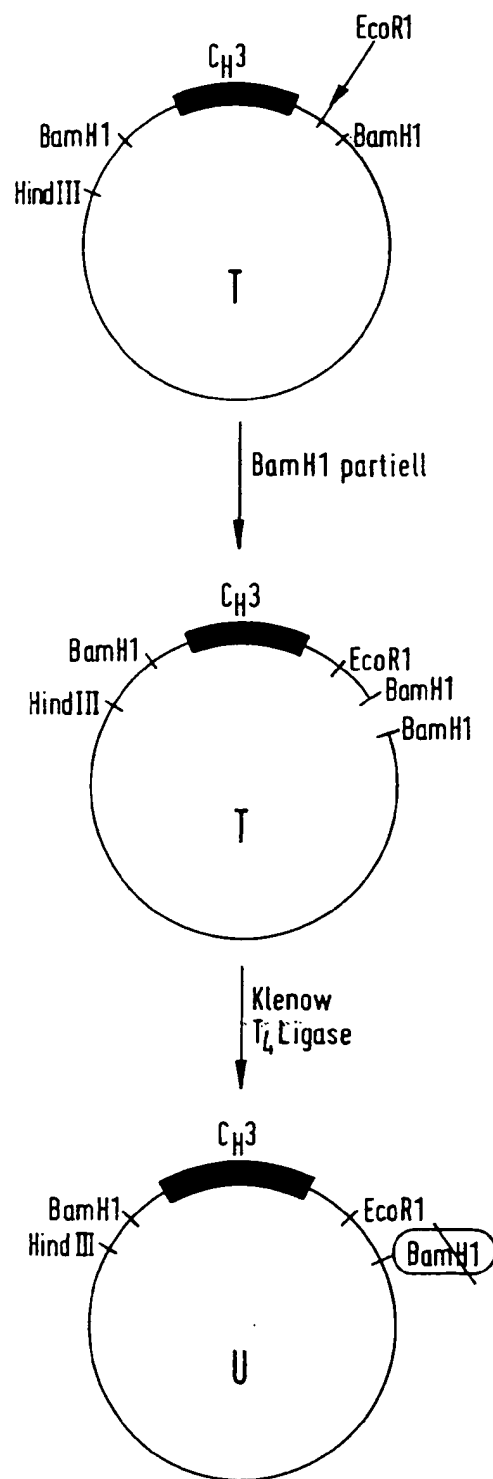


Fig. 22

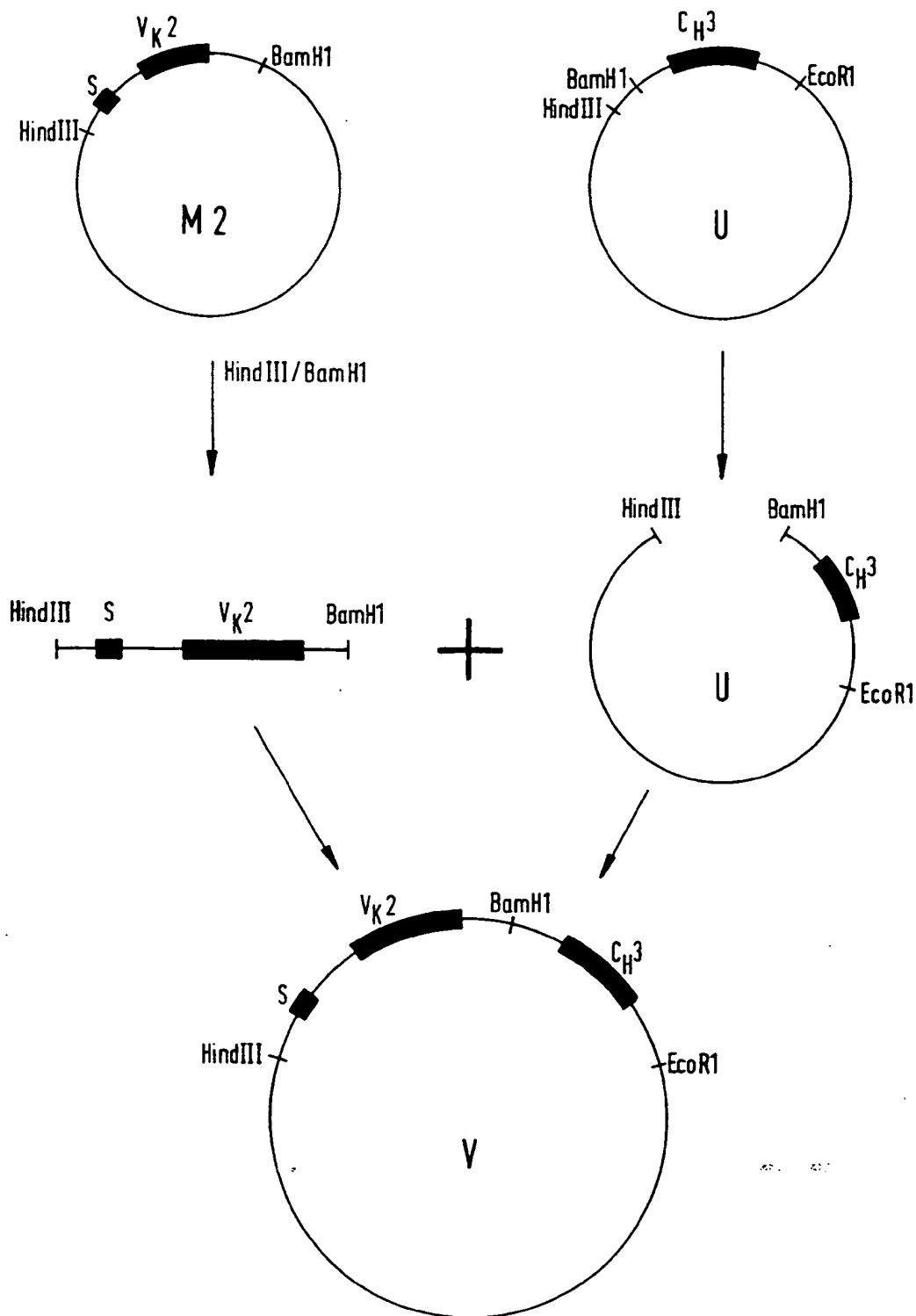


Fig.23

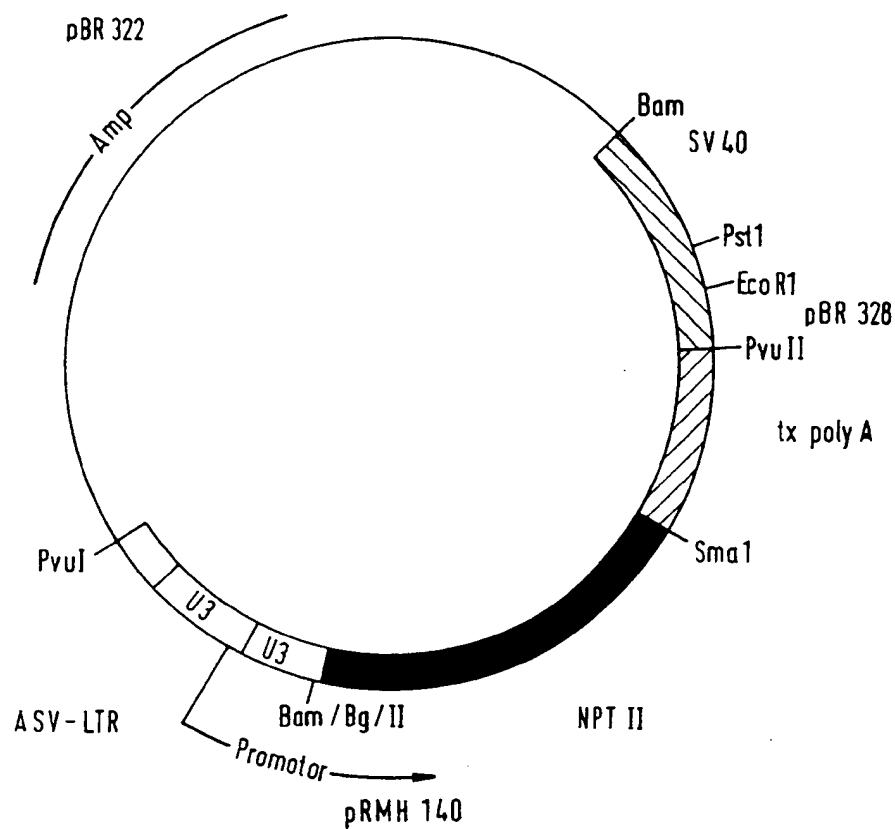
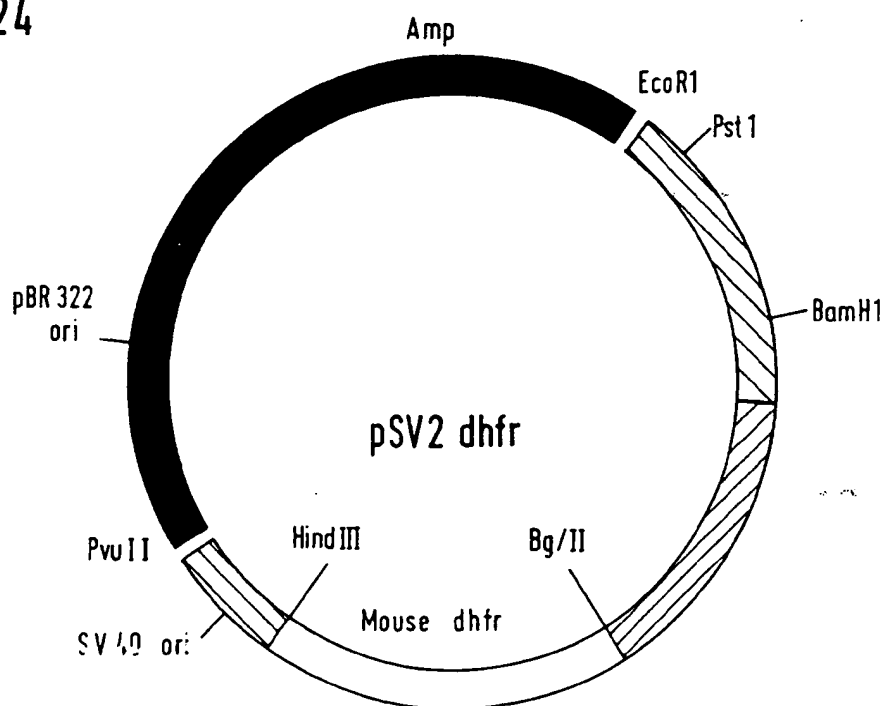


Fig.24



(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 517 024 A3**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 92108381.2

(51) Int. Cl.⁵: C12N 15/13, C07K 15/28

(22) Anmeldetag: 18.05.92

(30) Priorität: 03.06.91 DE 4118120

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
09.12.92 Patentblatt 92/50

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT
SE

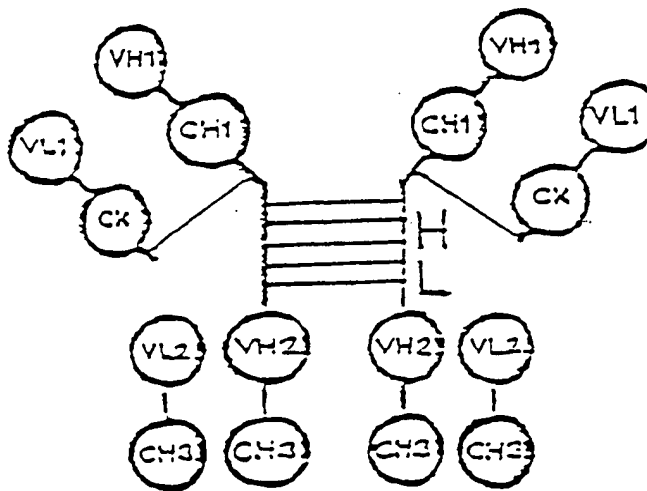
(86) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 14.07.93 Patentblatt 93/28

(71) Anmelder: **BEHRINGWERKE**
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
W-3550 Marburg 1(DE)

(72) Erfinder: **Bosslet, Klaus**
An der Haustatt 64
W-3550 Marburg(DE)
Erfinder: **Seemann, Gerhard**
Weissdornweg 32
W-3550 Marburg-Einhausen(DE)

(54) **Tetravalente bispezifische Rezeptoren, ihre Herstellung und Verwendung.**

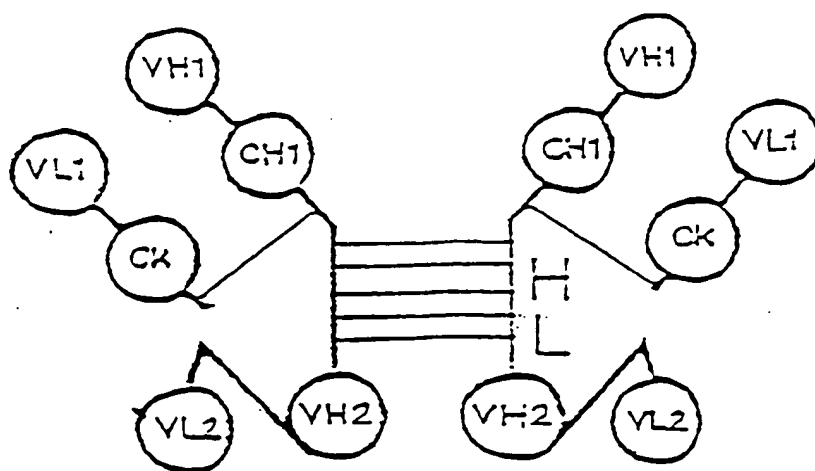
(57) Die Erfindung betrifft bispezifische, tetravalente Rezeptoren nach Formel I



Formel I

oder Formel II

EP 0 517 024 A3



Formel II

gegen ein tumorassoziertes Antigen und gegen ein gegen Tumoren wirksames Agens.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

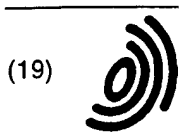
Nummer der Anmeldung

EP 92 10 8381
Seite 1

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	EP-A-0 419 387 (IMMUNOTECH PARTNERS) * Ansprüche * * Beispiel 5 *	1,2,5-7	C12N15/13 C07K15/28
D,Y	EP-A-0 404 097 (BEHRINGWERKE) * Ansprüche; Tabellen *	1-9	
Y	CANCER RESEARCH Bd. 50, Nr. 11, 1. Juni 1990, PHILADELPHIA PA, VS Seiten 3445 - 3452 J. LE DOUSSAL ET AL. 'Targeting of Indium 111-labeled bivalent hapten to human melanoma mediated by bispecific monoclonal antibody conjugates: Imaging of tumors hosted in nude mice.' * Zusammenfassung *	1-9	
A	BRITISH JOURNAL OF CANCER Bd. 63, Nr. 5, Mai 1991, LONDON, GB Seiten 681 - 686 K. BOSSLET ET AL. 'Generation of bispecific monoclonal antibodies for two phase radioimmunotherapy.' * Zusammenfassung * * Seite 685, rechte Spalte, Zeile 1 - Zeile 21 *	1-9	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5) C12N C07K
A	JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE Bd. 32, Nr. 5SUP, Mai 1991, NEW YORK, VS Seiten 915 - 916 L. ANDERSON ET AL. 'Comparison of DOTA and DTPA analogs for bifunctional antibody delivery of Indium-111 and Yttrium-90.' * Zusammenfassung 29 *	1-9	
A	WO-A-9 103 493 (UNIVERSITY OF SOUTHAMPTON) * Ansprüche; Abbildungen 1,2 *	1-9	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 29 APRIL 1993	Prüfer NOOIJ F.J.M.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument A : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 (01.82 (P0402))

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG	Abschlußdatum der Recherche 29 APRIL 1993	Prüfer NOOIJ F.J.M.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	



(19)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 0 517 024 B1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
13.08.1997 Patentblatt 1997/33

(51) Int Cl.⁶: **C12N 15/13, C07K 14/00**

(21) Anmeldenummer: **92108381.2**

(22) Anmeldetag: **18.05.1992**

(54) **Tetavalente bispezifische Rezeptoren, ihre Herstellung und Verwendung**

Tetavalent bispecific receptors, their preparation and use

Récepteurs tétravalents bispécifiques, leur préparation et utilisation

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT SE

(30) Priorität: **03.06.1991 DE 4118120**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
09.12.1992 Patentblatt 1992/50

(73) Patentinhaber: **BEHRINGWERKE
Aktiengesellschaft
35001 Marburg (DE)**

(72) Erfinder:
• **Bosslet, Klaus
W-3550 Marburg (DE)**
• **Seemann, Gerhard
W-3550 Marburg-Einhausen (DE)**

(74) Vertreter: **Fischer, Hans-Jürgen, Dr. et al
Hoechst AG
Patent- und Lizenzabteilung
Gebäude K 801
65926 Frankfurt am Main (DE)**

(56) Entgegenhaltungen:
**EP-A- 0 404 097 EP-A- 0 419 387
WO-A-91/03493**

- **CANCER RESEARCH**, Bd. 50, Nr. 11, 1. Juni 1990, PHILADELPHIA PA, VS, Seiten 3445-3452; **J. LE DOUSSAL ET AL.:** 'Targeting of Indium 111-labeled bivalent hapten to human melanoma mediated by bispecific monoclonal antibody conjugates: Imaging of tumors hosted in nude mice'.
- **BRITISH JOURNAL OF CANCER**, Bd. 63, Nr. 5, Mai 1991, LONDON, GB, Seiten 681-686; **K. BOSSLET ET AL.:** 'Generation of bispecific monoclonal antibodies for two phase radioimmunotherapy.'
- **JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE**, Bd. 32, Nr. 5SUP, Mai 1991, NEW YORK, VS, Seiten 915-916; **L. ANDERSON ET AL.:** 'Comparison of DOTA and DTPA analogs for bifunctional antibody delivery of Indium-111 and Yttrium-90.'

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

EP 0 517 024 B1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Beschreibung

Die Erfindung betrifft tetravalente bispezifische Rezeptoren, die gentechnisch durch Fusion der DNA, die für die schwere Kette eines $F(ab')_2$ Fragmentes eines Antikörpers (I) kodiert mit (a) DNA, welche für die schwere Kette eines $F(ab')_2$ Moleküls eines zweiten Antikörpers (II) kodiert, bei dem die C_H1 Domäne durch eine C_H3 Domäne ersetzt ist (Formel I), oder mit (b) der DNA, die für ein "single chain" F_V -Fragment eines Antikörpers (II) kodiert (Formel II), mittels geeigneter Linker hergestellt werden. Die Expression dieser Fusionsgene in Säugerzellen zusammen mit den Genen für die entsprechenden leichten Ketten, welche im Falle des Konstruktes (a) zum einen aus einem V_L Exon der Spezifität I und einem C_K Exon und zum anderen aus einem V_L Exon der Spezifität II und einem C_H3 Exon und im Falle des Konstruktes (b) nur aus einem V_L Exon der Spezifität I und einem C_K Exon besteht, ergibt tetravalente bispezifische Rezeptoren. Die C_H1 Domänen sind dabei mit den V_H2 Domänen über 1 bis 10 Hinge-Regionen (H) und einen geeigneten Peptidlinker L verbunden. Vorzugsweise werden die in der Europäischen Patentanmeldung EP-A2-0404 097 beschriebenen Antikörper-Spezifitäten eingesetzt. Dies sind u.a. zum einen Spezifitäten, die gegen ein auf der Zellmembran oder im Interstitium befindliches Epitop eines tumorassoziierten Antigens gerichtet sind. Zum anderen sind dies Spezifitäten, die gegen hochmolekulare oder niedermolekulare Liganden gerichtet sind, die ihrerseits ein gegen Tumoren wirksames Agens binden oder aber direkt dieses Agens binden.

In der EP-A2-0404 097 werden bispezifische und oligospezifische, mono- und oligovalente Rezeptoren beschrieben, die gentechnisch durch Fusion von für $F(ab)$ Fragmente von Antikörper zweier oder mehrerer verschiedener Spezifitäten kodierende DNA mittels geeigneter Linker hergestellt werden. Vorzugsweise ist eine Spezifität dabei entweder gegen ein auf der Zellmembran oder im Interstitium befindliches Epitop eines Tumorassoziierten Antigens (TAA) oder gegen ein Epitop im Tumorendothel (TE) gerichtet, während die weiteren Spezifitäten hochmolekulare oder niedermolekulare Liganden betreffen und z.B. mit den Komplexonen Äthylendiamintetraacetat bzw. Diäthylentriaminpentacetat in Yttrium 90 komplexierter Form (EDTA- ^{90}Y bzw. DTPA- ^{90}Y) reagieren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bindung mit den Komplexonen am Komplexon-Rezeptor-Arm über fos-jun Interaktion (oder auch Avidin-Biotin Interaktion). Weitere bevorzugte Spezifitäten haben katalytische Eigenschaften.

Bispezifische Antikörper wurden bisher nach folgenden Methoden hergestellt

- chemische Kopplung von Antikörpern verschiedener Spezifität über heterobifunktionelle Linker (H. Paulus, Behring Inst. Mitt. 78, (1985), 118-132)
- Fusion von bereits vorhandenen Hybriden, die verschiedene monoklonale Antikörper (MAK) ausscheiden, und Isolation des bispezifisch-monovalenten Anteiles (U.S. Staerz und M.J. Bevan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, (1986) 1453-1457)
- Transfektion der leichten und schweren Kettengene zweier verschiedener MAK (4Gene) in murine Myelomzellen oder andere eukaryotische Expressionssysteme und Isolation des bispezifisch-monovalenten Anteiles (U. Zimmermann, Rev. Physio. Biochem. Pharmacol. 105 (1986), 176-260; J. van Dijk et al., Int. J. Cancer 43, (1989), 944-949).

Solche bispezifische Antikörper werden zur Therapie und Diagnostik von malignen Tumoren eingesetzt. Das Prinzip des Verfahrens besteht darin, daß im ersten Schritt durch Injektion des bispezifischen Makromoleküls über längere Zeiträume und mit hohen Dosen eine Absättigung der Epitope, die von einer der beiden Spezifitäten auf den Zielzellen erkannt werden, erreicht wird. Im zweiten Schritt, der aus einer mehrtägigen Unterbrechung der Behandlung besteht, findet die Autoelimination des unspezifisch adsorbierten bispezifischen Antikörpers aus den Nicht-Zielgeweben statt.

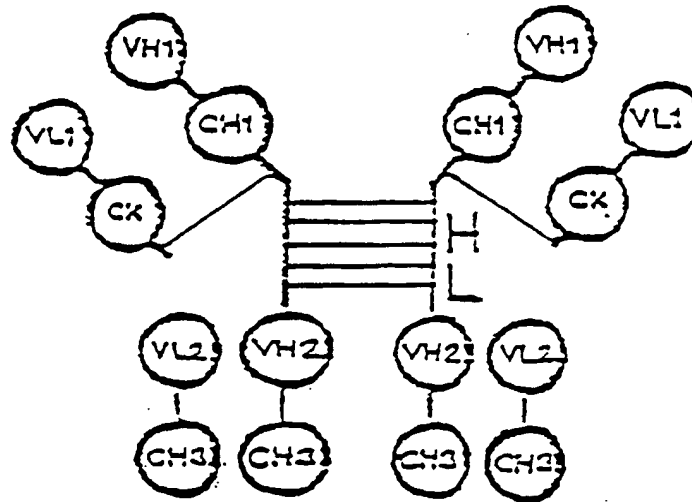
Diese Autoelimination kann durch Injektion eines mit Zuckerresten, vorzugsweise Galactose gekoppelten antiidiotypischen Antikörpers, der gegen den Anti-Tumor-Arm des bispezifischen Rezeptors gerichtet ist, beschleunigt werden.

Der dritte Schritt des Verfahrens besteht in der i.v. Injektion eines radiomarkierten, hydrophilen, sich nicht in Zellen anreichernden niedermolekularen Liganden mit kurzer Verweilzeit im Organismus, der hohe Komplexkonstanten für beta- und gamma-Strahler wie ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{99m}Tc oder ^{111}In hat und an den die zweite Spezifität des bispezifischen Antikörpers mit hoher Affinität bindet. Durch diesen Schritt wird eine Anreicherung des radioaktiven Liganden, verbunden mit längerem Verbleib am Zielgewebe erreicht, was die selektive Zerstörung des Zielgewebes zur Folge hat bzw. eine Diagnostik beispielsweise von Metastasen ermöglicht.

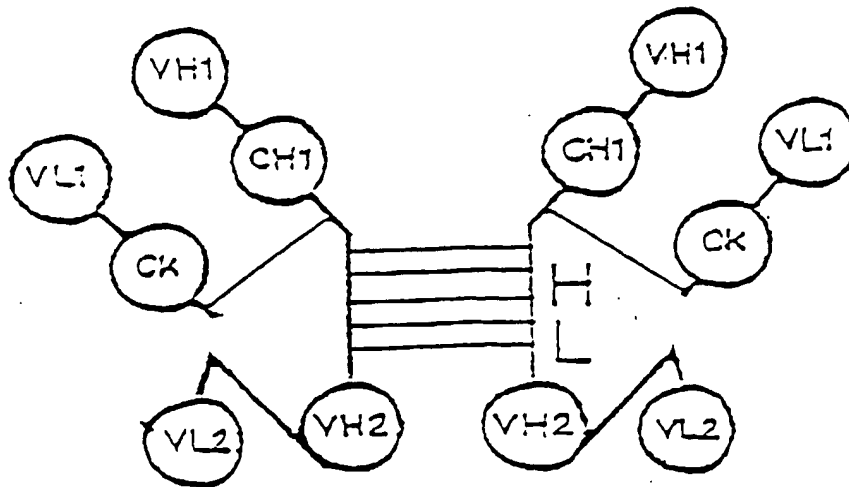
Wir haben gefunden, daß tetravalente bispezifische Rezeptoren gemäß Formel I oder Formel II besonders gut gentechnisch herstellbar sind, da sie wesentlich effizienter exprimiert werden als andere Konstrukte. Hinzu kommt, daß die Avidität der ursprünglichen Antikörper zu den entsprechenden Antigenen bei den erfindungsgemäßen Konstrukten erhalten bleibt. Bevorzugt sind Konstrukte mit 1 bis 5, ganz bevorzugt 1 Hinge Region zwischen C_H1 und V_H2 , da solche Konstrukte besonders effizient in BHK-Zellen exprimiert werden. Als Linker werden vorzugsweise die Sequenzen entsprechend der Peptidsequenz $(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_x$ mit $x = 3$ bis 5 oder $GEAAPAAAPAAAAAGG$ einge-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

setzt. Im übrigen werden die in vorgenannter EP-A2-0404 097 beschriebenen oder bevorzugten Antikörper-V-Gen-Fragmente bzw. Spezifitäten auch hier vorzugsweise eingesetzt.



Formel I



Formel II

H = Hinge
L = Linker
— = Peptidbindung
— = Disulfidbrücke

Im folgenden wird beispielhaft die Konstruktion eines Fusionsgens beschrieben, welches für ein tetra-valentes bispezifisches Rezeptormolekül kodiert. Wenn nicht anders vermerkt, sind die dabei verwendeten Techniken dem Buch

THIS PAGE BLANK (USPTO)

"Molecular Cloning: A Laboratory Manual" entnommen (T. Maniatis et al., 1989). Weitere Einzelheiten sind in EP-A2-0404 097 beschrieben, auf die hier besonders Bezug genommen wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft folglich bispezifische tetravalente Rezeptoren gemäß Formel I oder Formel II, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung. Vorzugsweise ist eine Spezifität gegen animale oder humane tumorspezifische Antigene gerichtet

und die andere Spezifität besitzt katalytische oder enzymatische Aktivität oder ist gegen einen Komplexbildner gerichtet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stammt eine Spezifität von den monoklonalen Antikörpern mit den variablen Regionen gemäß Tab. 2, 3, 4 oder 5 aus EP-A2-0404 097 mit folgenden Sequenzen:

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 2 MAK A

VH

5 Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L
 CAGGTCCAACTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGAGACTC
 10 20 30 40 50 60

10 S C A T S G F S D Y Y M N W V R Q P P G
 TCCTGCGCAACTTCTGGGTTCACTGATTACTACATGAAGTGGTCCGCCAGCCTCCAGGA
 70 80 90 100 110 120

15 K A L E W L G F I S N K P N G H T T E Y
 AAAGCACTTGAGTGGTTGGGTTTTATTTCAAACAAACCTAATGGTCACACAACAGAGTAC
 130 140 150 160 170 180

20 S A S V K G R F T I S R D N S Q S I L Y
 AGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTAT
 190 200 210 220 230 240

25 L Q M N T L R A E D S A T Y Y C A R D K
 CTTCAAAATGACACCCCTGAGAGCTGAGGACAGTGCCACTTATTATTGTGCAAGAGATPAG
 250 260 270 280 290 300

30 G I R W Y F D V W G Q G T T V T V S S
 GGAATACGATGGTACTTCCATGTCTGGGGCCAAGGGACCGGTACCGGTCTCTCTCA
 310 320 330 340 350

VK

35 A I L S A S P G E K V T M T C R A S S S
 AGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTGACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAG
 10 20 30 40 50 60

40 V S Y M H W Y Q Q K P G S S P K P W I Y
 TGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAACCCTGGATTTA
 70 80 90 100 110 120

45 A T S N L A S G V P A R F S G S G S G T
 TGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
 130 140 150 160 170 180

50 S Y S L T I I R V E A E D A A T Y Y C Q
 CTCTTACTCTCTCACAATCATCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA
 190 200 210 220 230 240

55 Q W S S N P L T F G A G T K L E I
 GCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGATC
 250 260 270 280 290

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 3 MAK B
VH

5 L Q E S G P D L V K P S Q S L S L T C T
CTGCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCACT
10 V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P G
GTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGGCAGTTTCCAGGA
15 N K L E W M G Y I Q Y S G I T N Y N P S
AACAACTGGATGGATGGGCTACATACAGTACAGTGGTATCACTAACTACAACCCCTCT
20 L K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q L
CTCAAGAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACATCCAGAACCAGTTCTTCCCTGCAGTTG
25 N S V T T E D T A T Y Y C A R E D Y D Y
AATTCAGTCACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGAAGACTATGATTAC
30 H W Y F D V W G A G T T V T V S S
CACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
35 L T Q S P A I M S A S L G E E I T L T C
CTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGAGATCACCCCTAACCTGC
40 S T S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
AGTACCAGCTCGAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTTCTCCC
45 K L L I Y S T S N L A S G V P S R F S G
AAACTCTTGATTATAGCACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCAGTGGC
50 S G S G T F Y S L T I S S V E A E D A A
AGTGGGTCTGGGACCTTTTATTCTCTCACAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCC
55 D Y Y C H Q W S S Y P T F G G G T K L E
GATTATTACTGCCATCAGTGGAGTAGTTATCCACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAG

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 4 MAK C

VH

5 Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K M
CAGGTCCAAGTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATG
10 20 30 40 50 60

10 S C K A S G Y T F T Y Y V I H W V K Q K
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTTACTATGTTATTCAGTGGGTGAACAGAAG
70 80 90 100 110 120

15 P G Q G L E W I G Y I H P Y N A G T E Y
CCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATACATTCCTTACAATGCTGGTACTGAGTAC
130 140 150 160 170 180

20 N E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y
AATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCAGAGCCTAC
190 200 210 220 230 240

25 M E L S S L T S E D S A V Y Y C S M G R
ATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAATGGGACGA
250 260 270 280 290 300

30 G G D Y W G Q G T T V T V S S
GGGGGTGACTACTGGGGCCAGGGACCCAGGTCCCGTCTCTCTCA
310 320 330 340

VK

35 L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C
CTGACCCAGTCTCTCCAGCAATTATGTCTGCATCTCCTGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC
10 20 30 40 50 60

40 S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCC
70 80 90 100 110 120

45 K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G
AAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC
130 140 150 160 170 180

50 S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A
AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGCCTGAAGATGCTGCC
190 200 210 220 230 240

55 T Y Y C Q Q W S S N P F T F G A G T K L
ACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTCCGCGGGGGACCAAGCTG
250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 5 MAK D
VH

5 A E S G P G L V R L T S L S I T C T V S
GCAGAGTCAGGGCCTGGCCTGGTGGCGCTCAGGAGCCTGTCCATCACTTGCCTGTCTCT
 10 20 30 40 50 60

10 G F S L I S Y G V H W V R Q P P G K G L
GGCTTTTCATTAATTAGTTATGGTGTACACTGGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTG
 70 80 90 100 110 120

15 E W L G V I W A G G S T N Y N S A L M S
GAGTGGCTGGGAGTAATATGGGCAGGTGGAAGCACAAATTATAATTCGGCTCTCATGTCC
 130 140 150 160 170 180

20 R L S I S K D N S K S Q V F L K M N S L
AGACTGAGCATCAGCAAAGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTG
 190 200 210 220 230 240

25 Q T G D T A I Y Y C A R G G D D Y D G F
CAAAGTGGTGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAGGGGGGATGATTACGATGGGTTT
 250 260 270 280 290 300

30 A Y W G Q G T T V T V S S G E S
GCTTACTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTCC
 310 320 330 340

VR

35 L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C
CTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTGACGAGGAGAGGTCACTATGAGCTGC
 10 20 30 40 50 60

40 K S S Q S L L S S T K R K N Y L A W Y Q
AAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAGCAGTACAAAGCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAG
 70 80 90 100 110 120

45 Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G
CAGAAACCAGGTCACTCTCCTAAACTACTGATCTACTGGGCATCCACTCGGGAATCTGGG
 130 140 150 160 170 180

50 Y P D R F T G S G S G T D F T L T I S S
GTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT
 190 200 210 220 230 240

55 V Q A E D L A V Y Y C K Q S Y N L R A F
GTGCAGGCTGAGACCTGGCAGTTTATTACTGCCAACAATCTTATAATCTTCGGGGCGTTC
 250 260 270 280 290 300

 G G G T K L E I K
GGTGGAGGACCAAGCTGGAGATCAA
 310 320

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Beispiel 1:

Ein Derivat eines M13 Phagen (V_H PCR), welches den 5' Teil eines schwere Ketten Gens bestehend aus Promoterregion, Signalexon, Intron 1, V_H Exon und Intron 2 enthält (R. Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 3833-3837, 1988) wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und BamHI gespalten, das Insert isoliert und in einen HindIII/BamHI gespaltenen KS+ Phasmid (pBluescript KS^R+, Stratagene LaJolla, CA, USA) kloniert. Durch Restriktionsanalyse und Nukleinsäuresequenzanalyse wurde der Phasmidklon (A) identifiziert, der das aus dem V_H PCR ausgeschnittene Insert enthält (Fig. 1).

Beispiel 2:

Der Phasmidklon (A) wurde mit XbaI und HindII gespalten, die XbaI Schnittstellen mit Klenow Polymerase und dNTPs aufgefüllt und das DNA Fragment mit dem V Gen Exon isoliert. Das isolierte DNA Fragment wurde dann in einen KS+ Phasmid kloniert, aus dem durch einen PvuII Verdau der Polylinker und dem Polylinker benachbarte Bereiche entfernt worden waren. Es wurde der Klon (B) identifiziert, der das V_H Insert und die zwischen den XbaI und BamHI bzw. HindII und HindIII Schnittstellen gelegenen Bereiche des KS+ Polylinkers enthält (Fig. 2). Der Phasmid B wurde verwendet, um die V_H Gene der Antikörper I und II (V_{H1} und V_{H2}) nach Amplifikation aus der cDNA der Hybridzellen zu klonieren. Die Amplifikation der V_H Gene erfolgte nach der von R. Orlandi et al. (1989, a.a.o.) beschriebenen Methode. Der Phasmidklon B mit dem V_{H1} Gen wird als B1 und der Phasmidklon B mit dem V_{H2} Gen als B2 bezeichnet (R.M. Hudziak et al., Cell., Vol. 31, 137-146, 1982; F. Lee et al., Nature, Vol. 294, 228, 1981).

Beispiel 3:

Ein pUC 19 Plasmid, der das C_H1 Exon und das erste Hinge Exon eines humanen IgG₃ Gens enthält (EP A2-0404097; Fig. 3 ibidem: IgG₃ (F(ab')₂ 1H)), wurde mit der Restriktionsendonuklease HindIII gespalten und die Schnittstellen mit Klenow DNA Polymerase aufgefüllt. Dann wurde mit PstI partiell gespalten, das DNA Fragment mit dem C_H1 Exon und dem H₁ Exon isoliert und in einen mit PstI und HindII gespaltenen pUC 18 Plasmid kloniert. Es wurde der Klon (C) isoliert, der 5' des Insert eine BamHI und 3' des Inserts eine HindIII Schnittstelle trägt (Fig. 3).

Beispiel 4:

Der Plasmidklon C wurde mit HindIII gespalten, die Schnittstellen mit Klenow DNA Polymerase aufgefüllt. Dann mit BamHI das Insert mit den C_H1 und H₁ Exons ausgeschnitten, isoliert und in einen KS+ Plasmid (pBluescript^R IKS+, Stratagene, LaJolla, CA, USA) kloniert. Der KS+ Plasmid war mit XbaI gespalten, die XbaI Schnittstellen mit Klenow DNA Polymerase aufgefüllt und anschließend mit BamHI nachgeschnitten worden. Es wurde der Phasmidklon (D) isoliert, der das Insert mit den C_H1 und Hinge 1 Exons in einer Orientierung enthält, bei der sich auf der 5' Seite des Inserts eine BamHI und eine HindIII Schnittstelle befinden (Fig. 4).

Beispiel 5:

Der Phasmidklon (B1) wurde mit HindIII und BamHI gespalten, das Insert mit dem V_H Gen des Antikörpers I isoliert und in den ebenfalls mit HindIII und BamHI gespaltenen Vektor (D) kloniert. Es wurde der Klon (E) isoliert, der das V_{H1} Gen, das C_H1 und das Hinge 1 Exon enthält (Fig. 5).

Beispiel 6:

Aus dem Phasmidvektor B2 wurde mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) unter Verwendung der Oligonukleotide V_H Oligol und V_H OligoII (Tab. 1) ein DNA Fragment amplifiziert (F), welches ein um einen Linker verlängertes V_H Gen enthält und an seinem 5' Ende eine gespaltene PvuII und an seinem 3' Ende eine BamHI Schnittstelle trägt (Fig. 6). Dieses Fragment wurde mit BamHI gespalten und in einen BamHI/PvuII gespaltenen KS+ Vektor kloniert, bei dem vorher eine der beiden internen PvuII Schnittstellen durch Asp718/PvuII Spaltung, Auffüllen der Schnittstellen und Religation zerstört worden war.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 1:

V_HOligoI:

5' PvuII
CT.GCC.GCC.CCC.GCA.GCC.GCA.
 GCC.GCA.GGC.GGC.CAG.GTC.CAA.CTG.CAG.GAG.
 AGC.GGT.CCA.GG 3'

V_HOligoII:

BamHI
 5' CGG.GGA.TCC.TAT.AAA.TCT.CTG.GC 3'

Es wurde der Phasmidklon (F) isoliert, der das amplifizierte Fragment enthält (Fig. 6).

Beispiel 7:

Die Oligonukleotide OligoIII und IV (Tab. 2) wurden miteinander hybridisiert und das entstehende DNA Fragment in den mit PvuII gespaltenen Phasmidklon (F) ligiert (Fig. 7). Es wurde der Phasmidklon (G) isoliert, der ein Fusionsexon aus einem Hinge Exon, einem Oligonukleotidlinker und dem V_H2 Gen enthält.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 2:

Oligo III:

5' Hind III Sph I

GCG.GAA.GCT.TCG.GGC.ATG.CTA.ATC.TTC.TCT.CTT.GCA.GAG.

CCC.AAA.TCT.TGT.GAC.ACA.CCT.CCC.CCG.TGC.CCA.AGG.TGC.

CCA.GGA.CAG

 3'

Oligo IV:

5' CTG.TCC.TGG.GCA.CCT.TGG.GCA.CGG.GGG.AGG.TGT.GTC.ACA.
AGA.TTT.GGG.CTC.TGC.AAG.AGA.GAA.GAT.TAG.CAT.GCC.CGA.
AGC.TTC.CGC Sph I
Hind III 3'

Beispiel 8:

Aus dem Plasmidklon 54.1.24, der ein humanes IgG₃ C-Gen enthält (EP-A2-0404097, Fig. 2) wurde mit den Oligonukleotiden V und VI (Tab. 3) das C_H3 Exon und der 3' NT Bereich des IgG₃ Gens herausamplifiziert und in die BamH1 und EcoRI Schnittstellen eines pUC19 Plasmids kloniert (Fig. 8). Es wurde der Plasmidklon (H) isoliert, der das C_H3 Exon des IgG₃ Gens enthält.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 3:

Oligo V:

5' BamH1 3'

CC.TCT.GCC.CTG GGA TCC.ACC.GCT.GTG.CC

Oligo VI:

5' EcoRI
AAC.CAT.CAC.GAA.TTC.ACA.GGG.GCC 3'

Beispiel 9:

Der Plasmidklon (H) wurde mit BamHI und EcoRI gespalten und das DNA Fragment, welches das C_H3 Exon trägt, in den mit BamHI und EcoRI gespaltenen Phasmidklon (G) kloniert (Fig. 9). Es wurde der Phasmidklon (I) isoliert, der das Hinge/ Linker/V_H2 Fusionsexon und das C_H3 Exon enthält.

Beispiel 10:

Die Phasmidklone (E) und (I) wurden mit HindIII und SphI gespalten. Das Insert des Klon (E) wurde in die HindIII und SphI Schnittstellen des Phasmidklons (I) kloniert. Es wurde der Phasmidklon (K) isoliert, der ein Ig schwere Ketten Fusionsgen enthält, welches aus Signalexon, V_H1 Exon, C_H1 Exon, Hingel Exon, Hinge/ Linker/V_H2 MAKII Fusionsexon und C_H3 Exon besteht (Fig. 10).

Beispiel 11:

Aus dem Phasmidklon (K) wurde das HindIII-EcoRI Fragment mit dem Fusionsgen ausgeschnitten und in einen pAB Stop Expressionsvektor kloniert (Fig. 19, (pAB Stop ist ein Derivat des pAB 3 Vektors (G. Zettlmeißl et al., B1M, 82, 26-34, (1988), bei dem das AT III Gen durch einen Polylinker ersetzt wurde), dessen BamHI Fragment durch einen EcoRI Linker ersetzt worden war. Es wurde der Klon (L) isoliert, der das Fusionsgen enthält (Fig. 11). Der Klon (L) wurde aufgebaut und für Transfektionen in Säugerzellen verwendet.

Beispiel 12:

Konstruktion leichte Kette Gen:

Der Phasmidklon (B) wurde mit HindIII und BamHI gespalten und das V_H Insert durch das aus dem Vektor V_KPCR (R. Orlandi et al. 1989, a.a.o.) isolierte V_K Insert ersetzt. Es wurde der Phasmidklon (M) isoliert, der ein Signalexon und ein V_K Exon trägt (Fig. 12). Der Phasmidklon wurde verwendet, um die amplifizierten V_K Gene der MAK I und II zu klonieren. Der Vektor M mit dem V_K1 Gen wurde als M1 und der Vektor M mit dem V_K2 Gen wurde als M2 bezeichnet.

Beispiel 13:

Das humane C_K Gen (Hieter et al., J. of Biol. Chem., 257: 1516-1522, 1982) wurde als EcoRI Fragment isoliert und in die SmaI Schnittstelle eines pUC 19 kloniert. Es wurde der Klon (N) isoliert, der das humane C_K Gen enthält

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(Fig. 13).

Beispiel 14:

Der Klon (N) wurde mit EcoRI und HindIII gespalten, das C_K Insert isoliert und in einen EcoRI/HindIII gespaltenen KS+ Vektor kloniert. Es wurde der Phasmidklon (O) isoliert, der das C_K Insert enthält (Fig. 14).

Beispiel 15:

Der Klon (O) wurde mit BamHI gespalten, das C_K Insert isoliert und in einen BamHI gespaltenen pAB Stop Vektor kloniert. Es wurde der Klon (P) isoliert, der das C_K Insert in einer Orientierung enthält, in der das 5' Ende des C_K Gens in der Nähe der HindIII Schnittstelle des pAB Stop Vektors liegt (Fig. 15).

Beispiel 16:

Der Klon (P) wurde partiell mit BamHI gespalten, die Schnittstellen mit Klenow DNA Polymerase aufgefüllt und religiert. Es wurde der Klon (Q) identifiziert, bei dem die BamHI Schnittstelle 3' des C_K Gens zerstört ist (Fig. 16).

Beispiel 17:

Der Phasmidklon (M1) mit dem V_K1 Gen wurde mit HindIII und BamHI gespalten. Das Insert mit dem V_K Gen wurde isoliert und in die HindIII und BamHI Schnittstelle des Expressionsvektors (Q) ligiert. Es wurde der Klon (R) identifiziert, der ein intaktes Kappa leichte Ketten Gen mit Spezifität des Antikörpers I enthält (Fig. 17).

Beispiel 18:

Der Plasmidklon (H) mit den C_H3 Exon des humanen IgG₃ Gens wurde mit EcoRI und HindIII gespalten, das C_H3 Insert isoliert und in einen EcoRI/HindIII gespaltenen KS+ Vektor kloniert. Es wurde der Phasmidklon (S) isoliert, der das C_H3 Insert enthält (Fig. 18).

Beispiel 19:

Der Klon (S) wurde mit BamHI gespalten, das C_H3 Insert isoliert und in einen BamHI gespaltenen pAB Stop Vektor (Fig. 19) kloniert. Es wurde der Klon (T) isoliert, der das C_H3 Insert in einer Orientierung enthält, in der das 5' Ende des C_H3 Exons in der Nähe der HindIII Schnittstelle des pAB Stop Vektors liegt (Fig. 20).

Beispiel 20:

Der Klon T wurde partiell mit BamHI gespalten, die Schnittstelle mit Klenow DNA Polymerase aufgefüllt und religiert. Es wurde der Klon (U) identifiziert, bei dem die BamHI Schnittstelle 3' des C_H3 Gens zerstört ist (Fig. 21).

Beispiel 21:

Der Phasmidklon (M2) mit dem V_K2 Gen wurde mit HindIII und BamHI gespalten. Das Insert mit dem V_K Gen wurde isoliert und in die HindIII und BamHI Schnittstellen des Expressionsvektors (U) ligiert. Es wurde der Klon (V) identifiziert, der ein intaktes leichte Ketten Gen mit Spezifität des Antikörpers II und ein C_H3 Exon als konstante Region enthält (Fig. 22).

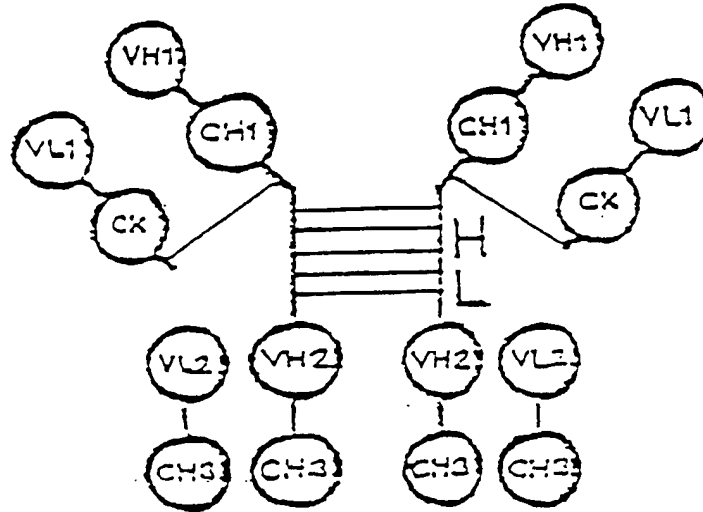
Die Expressionsplasmide L, R und V wurden zusammen mit geeigneter, Selektionsmarker-tragenden Phasmiden, wie z.B. pRMH140 (Fig. 23) (R.M. Hudziak et al., 1982, a.a.o.) oder pSV2dhfr (Fig. 24) (F. Lee et al., 1981, a.a.o.), in Säugerzellen kotransfiziert (30), durch Selektionsdruck Transfektomaklone selektioniert und durch Testung der Überstände mittels geeigneter Assays solche Transfektomaklone identifiziert, die bivalente tetraspezifische Rezeptormoleküle sezernieren.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patentansprüche

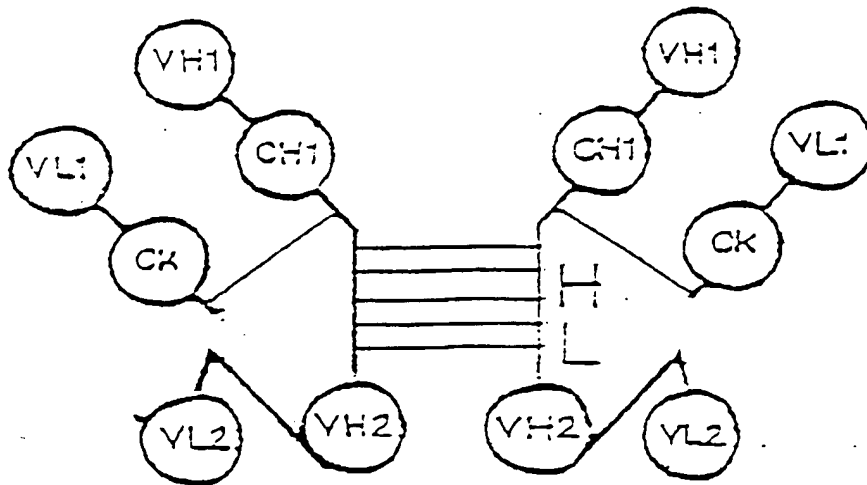
Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : AT, BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, NL, LU, PT, SE

1. Bispezifische, tetravalente Rezeptoren nach Formel I



Formel I

oder Formel II



Formel II

dadurch gekennzeichnet, daß nur die zusammengehörigen V_L und V_H -Paarungen gebildet werden und die C_H1 Domänen mit den V_H^2 Domänen über 1 bis 10 Hinge-Regionen H und einen geeigneten Peptidlinker L verbunden sind, wobei die Disulfidbrücken (dünne Striche) im Bereich der Hinge-Regionen die Dimerisierung der bivalenten Halbmoleküle bewirken.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. Rezeptoren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumor-assoziierte Antigene gerichtet ist.
3. Rezeptoren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität katalytische oder enzymatische Aktivität besitzt.
4. Rezeptoren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumor-assoziierte Antigene gerichtet ist und die andere Spezifität katalytische oder enzymatische Aktivität besitzt.
5. Rezeptoren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumor-assoziierte Antigene gerichtet ist und eine andere Spezifität gegen ein Komplexon gerichtet ist.
6. Rezeptoren nach Anspruch 1, 2, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität von den monoklonalen Antikörpern mit den variablen Regionen gemäß Tab. 2, 3, 4 oder 5 mit folgenden Sequenzen stammt:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 2 MAK A

VH

5 Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L
 CAGGTCCAAC TGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGAGACTC
 10 20 30 40 50 60

10 S C A T S G F S D Y Y M N W V R Q P P G
 TCCTGCGCAACTTCTGGGTTTCAGTGATTACTACATGAACTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGA
 70 80 90 100 110 120

15 K A L E W L G F I S N K P N G H T T E Y
 AAAGCACTTGAGTGGTTGGGTTTTATTTCAAACAAACCTAATGGTCACACAACAGAGTAC
 130 140 150 160 170 180

20 S A S V K G R F T I S R D N S Q S I L Y
 AGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTAT
 190 200 210 220 230 240

25 L Q M N T L R A E D S A T Y Y C A R D K
 CTTCAAATGAACACCCCTGAGAGCTGAGGACAGTGGCACTTATTATTGTGCAAGAGATAAG
 250 260 270 280 290 300

30 G I R W Y F D V W G Q G T T V T V S S
 GGAATACGATGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGGGACCAAGGTCAAGGTCTCTCTCA
 310 320 330 340 350

VK

35 A I L S A S P G E K V T M T C R A S S S
 AGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAG
 10 20 30 40 50 60

40 V S Y M H W Y Q Q K P G S S P K P W I Y
 TGTAAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAACCCTGGATTTA
 70 80 90 100 110 120

45 A T S N L A S G V P A R F S G S G S G T
 TGCCACATCCAAACCTGGGTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGGAGTGGGTCTGGGAC
 130 140 150 160 170 180

50 S Y S L T I I R V E A E D A A T Y Y C Q
 CTCTTACTCTCTCAATCATCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA
 190 200 210 220 230 240

55 Q W S S N P L T F G A G T K L E I
 GCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCAGGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGATC
 250 260 270 280 290

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 3 MAK B
VH

5 L Q E S G P D L V K P S Q S L S L T C T
CTGCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCACT
 10 20 30 40 50 60

10 V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P G
GTCAGTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCACGA
 70 80 90 100 110 120

15 N K L E W M G Y I Q Y S G I T N Y N P S
AACAACTGGATGGATGGGCTACATACAGTACAGTGGTATCACTAACTACAACCCCTCT
 130 140 150 160 170 180

20 L K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q L
CTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACATCCAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTG
 190 200 210 220 230 240

25 N S V T T E D T A T Y Y C A R E D Y D Y
AATTCAGTCACTACTGAGGACACAGCCCATATTACTGTGCAAGAGAAGACTATGATTAC
 250 260 270 280 290 300

30 H W Y F D V W G A G T T V T V S S
CACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA
 310 320 330 340 350

VK

35 L T Q S P A I M S A S L G E E I T L T C
CTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGAGATCACCCCTAACCTGC
 10 20 30 40 50 60

40 S T S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
AGTACCAGCTCGAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTTCTCCC
 70 80 90 100 110 120

45 K L L I Y S T S N L A S G V P S R F S G
AAACTCTTGATTTATAGCACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCAGTGGC
 130 140 150 160 170 180

50 S G S G T F Y S L T I S S V E A E D A A
AGTGGGTCTGGGACCTTTTATTCTCTCAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCC
 190 200 210 220 230 240

55 D Y Y C H Q W S S Y P T F G G G T K L E
GATTATTACTGCCATCAGTGGAGTAGTTATCCCACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGCAG
 250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 4 MAK C

VH

5 Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K M
CAGGTCCAACTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATG
10 20 30 40 50 60

10 S C K A S G Y T F T Y Y V I H W V K Q X
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTTACTATGTTATTCAGTGGGTGAAACAGAAG
70 80 90 100 110 120

15 P G Q G L E W I G Y I H P Y N A G T E Y
CCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATACATTCACTCCTTACAATGCTGGTACTGAGTAC
130 140 150 160 170 180

20 N E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y
AATGAGAAGTTCAAAGGCCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGGCACAGCCTAC
190 200 210 220 230 240

25 M E L S S L T S E D S A V Y Y C S M G R
ATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGGGTCTATTACTGTTCAATGGGACCA
250 260 270 280 290 300

30 G G D Y W G Q G T T V T V S S
GGGGGTGACTACTGGGGCCAGGGACCAAGGTCACCGTCTCCTCA
310 320 330 340

VK

35 L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C
CTGACCCAGTCTCCAGCAATTATGTCTGCATCTCCTGGGGAGAGGTCAACCATGACCTGC
10 20 30 40 50 60

40 S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
AGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGCACCTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCC
70 80 90 100 110 120

45 K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G
AAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC
130 140 150 160 170 180

50 S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A
AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCC
190 200 210 220 230 240

55 T Y Y C Q Q W S S N P F T F G A G T K L
ACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTCCGGCGGGGGACCAAGCTG
250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 5 MAK D
VH

5 A E S G P G L V R L T S L S I T C T V S
GCAGAGTCAGGGCCTGGCCTGGTGCGCCTCAGGAGCCTGTCCATCACTTGCCTGTCTCT
 10 20 30 40 50 60

10 G F S L I S Y G V H W V R Q P P G K G L
GGCTTTTCATTAAATTAGTTATGGTGTACACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTG
 70 80 90 100 110 120

15 E W L G V I W A G G S T N Y N S A L M S
GAGTGGCTGGGAGTAATATGGGCAGGTGGAAGCACAAATTATAATTCGGCTCTCATGTCC
 130 140 150 160 170 180

20 R L S I S K D N S K S Q V F L K M N S L
AGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTG
 190 200 210 220 230 240

25 Q T G D T A I Y Y C A R G G D D Y D G F
CAACTGGTGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAGGGGGGATGATTACGATGGGTTT
 250 260 270 280 290 300

30 A Y W G Q G T T V T V S S G E S
GCTTACTGGGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTCC
 310 320 330 340

VK

35 L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C
CTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTGTCAGCAGGAGAGAGGTCACTATGAGCTGC
 10 20 30 40 50 60

40 K S S Q S L L S S T K R K N Y L A W Y Q
AAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAGCAGTACAAAGCGAAGAAGTACTTGGCTTGGTACCAG
 70 80 90 100 110 120

45 Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G
CAGAAACCAGGTCACTCTCCTAACTACTGATCTACTGGGCATCCACTCGGGAATCTGGG
 130 140 150 160 170 180

50 Y P D R F T G S G S G T D F T L T I S S
GTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT
 190 200 210 220 230 240

55 V Q A E D L A V Y Y C K Q S Y N L R A F
GTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAAACAATCTTATAATCTTCGGGCGTTC
 250 260 270 280 290 300

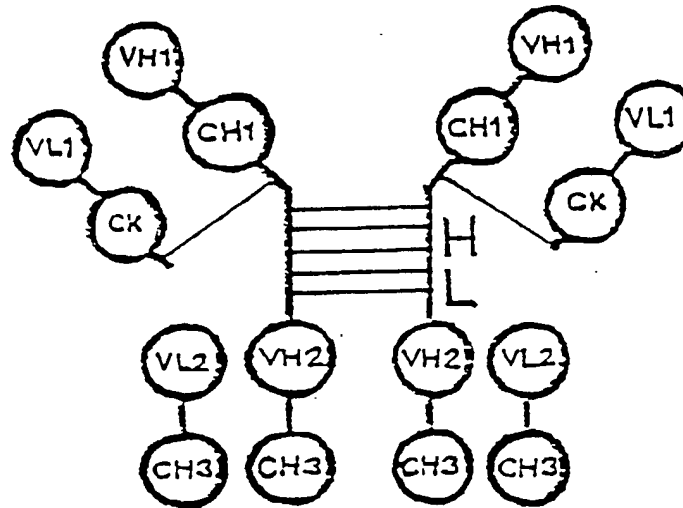
 G G G T K L E I K
GGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAA
 310 320

THIS PAGE BLANK (USPTO)

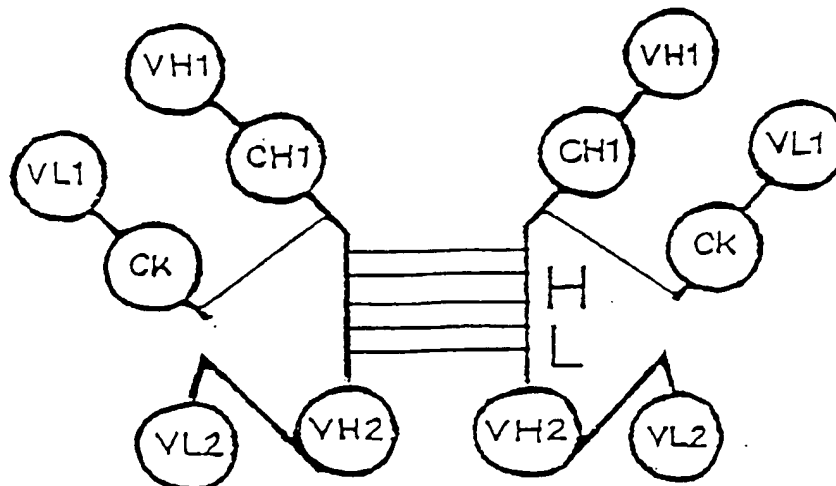
7. Rezeptoren nach Anspruch 1 bis Anspruch 6 als Arzneimittel.
8. Verfahren zur Herstellung von Rezeptoren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die für die schweren Ketten-Antikörperteile kodierenden DNA-Fragmente mittels Linker verbunden und in einem Expressionssystem zusammen mit den Genen für die leichten Ketten exprimiert werden.
9. Bispezifische, tetravalente Rezeptoren nach Formel I, bei denen die C_H3 Domänen durch humane C_H1 Domänen ersetzt sind.

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : GR, ES

1. Verfahren zur Herstellung von bispezifischen, tetravalenten Rezeptoren nach Formel I



oder Formel II



dadurch gekennzeichnet, daß nur die zusammengehörigen V_L und V_H -Paarungen gebildet werden und die C_H1 Domänen mit den V_H2 Domänen über 1 bis 10 Hinge-Regionen H und einen geeigneten Peptidlinker L verbunden werden, wobei die Disulfidbrücken (dünne Striche) im Bereich der Hinge-Regionen die Dimerisierung der bivalenten

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ten Halbmoleküle bewirken.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumors-
soziierte Antigene gerichtet ist.

5

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität katalytische oder enzymatische Aktivität
besitzt.

10

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumors-
soziierte Antigene und die andere Spezifität katalytische oder enzymatische Aktivität besitzt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität gegen animale oder humane tumors-
soziierte Antigene gerichtet ist und eine andere Spezifität gegen ein Komplexon gerichtet ist.

15

6. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine Spezifität von den monoklonalen
Antikörpern mit den variablen Regionen gemäß Tab. 2, 3, 4 oder 5 mit folgenden Sequenzen stammt:

20

25

30

35

40

45

50

55

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 2 MAK A

VH

5 Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L
 CAGGTCCAAGTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGAGACTC
 10 10 20 30 40 50 60
 10 S C A T S G F S D Y Y M N W V R Q P P G
 TCCTGCGCAACTTCTGGGTTCACTGATTACTACATGAACTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGA
 70 80 90 100 110 120
 15 K A L E W L G F I S N K P N G H T T E Y
 AAAGCACTTGAGTGGTGGGTTTATTTCAAACAAACCTAATGGTCACACAACAGAGTAC
 130 140 150 160 170 180
 20 S A S V K G R F T I S R D N S Q S I L Y
 AGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTAT
 190 200 210 220 230 240
 25 L Q M N T L R A E D S A T Y Y C A R D K
 CTTCAAATGAACACCTTGAGAGCTGAGGACAGTGCCACTTATTATTGTGCAAGAGATAAG
 250 260 270 280 290 300
 30 G I R W Y F D V W G Q G T T V T V S S
 GGAATACGATGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGGGACCAAGGTCACCGTCTCCTCA
 310 320 330 340 350

VK

35 A I L S A S P G E K V T M T C R A S S S
 AGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTACAAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAG
 10 20 30 40 50 60
 40 V S Y M H W Y Q Q K P G S S P K P W I Y
 TGTAAGTTACATGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAACCCCTGGATTTA
 70 80 90 100 110 120
 45 A T S N L A S G V P A R F S G S G S G T
 TGCCACATCCACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
 130 140 150 160 170 180
 50 S Y S L T I I R V E A E D A A T Y Y C Q
 CTCTTACTCTCTCAATCATCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA
 190 200 210 220 230 240
 55 Q W S S N P L T F G A G T K L E I
 GCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGATC
 250 260 270 280 290

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 3
VH

MAK B

5 L Q E S G P D L V K P S Q S L S L T C T
 CTGCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTCAAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCACT
 10 10 20 30 40 50 60

10 V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P G
 GTCAGTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGA
 70 80 90 100 110 120

15 N K L E W M G Y I Q Y S G I T N Y N P S
 AACAACTGGAATGGATGGGCTACATACAGTACAGTGGTATCACTAACTACAACCCCTCT
 130 140 150 160 170 180

20 L K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q L
 CTCAAAAGTCCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCACTTG
 190 200 210 220 230 240

25 N S V T T E D T A T Y Y C A R E D Y D Y
 AATTCAGTCACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGACAAGACTATGATTAC
 250 260 270 280 290 300

30 H W Y F D V W G A G T T V T V S S
 CACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
 310 320 330 340 350

VK

35 L T Q S P A I M S A S L G E E I T L T C
 CTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGAGATCACCCCTAACCTGC
 10 20 30 40 50 60

40 S T S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
 AGTACCAGCTCGAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCAGTCTCTCCC
 70 80 90 100 110 120

45 K L L I Y S T S N L A S G V P S R F S G
 AACTCTTGATTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCAGTGGC
 130 140 150 160 170 180

50 S G S G T F Y S L T I S S V E A E D A A
 AGTGGGTCTGGGACCTTTTATTCTCTCAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCC
 190 200 210 220 230 240

55 D Y Y C H Q W S S Y P T F G G G T K L E
 GATTATTACTGCCATCAGTGGAGTAGTTATCCACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAG
 250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 4 MAK C

VH

5 Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K M
 CAGGTCCAACCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATG
 10 20 30 40 50 60

10 S C K A S G Y T F T Y Y V I H W V K Q K
 TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTTACTATGTTATTCACTGGGTGAAACAGAAG
 70 80 90 100 110 120

15 P G Q G L E W I G Y I H P Y N A G T E Y
 CCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATACATTCACTTACAATGCTGGTACTGAGTAC
 130 140 150 160 170 180

20 N E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y
 AATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCAGCAGCCTAC
 190 200 210 220 230 240

25 M E L S S L T S E D S A V Y Y C S M G R
 ATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAATGGGACGA
 250 260 270 280 290 300

30 G G D Y W G Q G T T V T V S S
 GGGGCTGACTACTGGGGCCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
 310 320 330 340

VK

35 L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C
 CTGACCCAGTCTCCAGCAATTATGCTGTCATCTCCTGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC
 10 20 30 40 50 60

40 S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
 AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCC
 70 80 90 100 110 120

45 K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G
 AAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC
 130 140 150 160 170 180

50 S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A
 AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCC
 190 200 210 220 230 240

55 T Y Y C Q Q W S S N P F T F G A G T K L
 ACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTTCGGCGCGGGACCAAGCTG
 250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 5 MAK D
VH

5 A E S G P G L V R L T S L S I T C T V S
GCAGAGTCAGGGCCTGGCCTGGTGCGCCTCAGAGCCTGTCCATCACTTGCCTGTCTCT
10 20 30 40 50 60

10 G F S L I S Y G V H W V R Q P P G K G L
GGCTTTTCATTAATTAGTTATGGTGTACACTGGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTG
70 80 90 100 110 120

15 E W L G V I W A G G S T N Y N S A L M S
GAGTGGCTGGGAGTAATATGGGCAGGTGGAAGCACAATTATAATTCGGCTCTCATGTCC
130 140 150 160 170 180

20 R L S I S K D N S K S Q V F L K M N S L
AGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTG
190 200 210 220 230 240

25 Q T G D T A I Y Y C A R G G D D Y D G E
CAAACCTGGTGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAGGGGGGATGATTACGATGGGTTT
250 260 270 280 290 300

30 A Y W G Q G T T V T V S S G E S
GCTTACTGGGGCCAAGGCACCGGTCAACGTCTCCTCAGGTGAGTCC
310 320 330 340

VK

35 L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C
CTGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGGCTGTGTGTCAGGACAGAGGTCACCTATGAGCTGC
10 20 30 40 50 60

40 K S S Q S L L S S T K R K N Y L A W Y Q
AAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAGCAGTACAAAGCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAG
70 80 90 100 110 120

45 Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G
CAGAAACCAGGTCACTCTCCTAAACTACTGATCTACTGGGCATCCACTCGGGAATCTGGG
130 140 150 160 170 180

50 Y P D R F T G S G S G T D F T L T I S S
GTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGT
190 200 210 220 230 240

50 V Q A E D L A V Y Y C K Q S Y N L R A F
GTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAACAATCTTATAATCTTCGGGGCGTTC
250 260 270 280 290 300

55 G G G T K L E I K
GGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
310 320

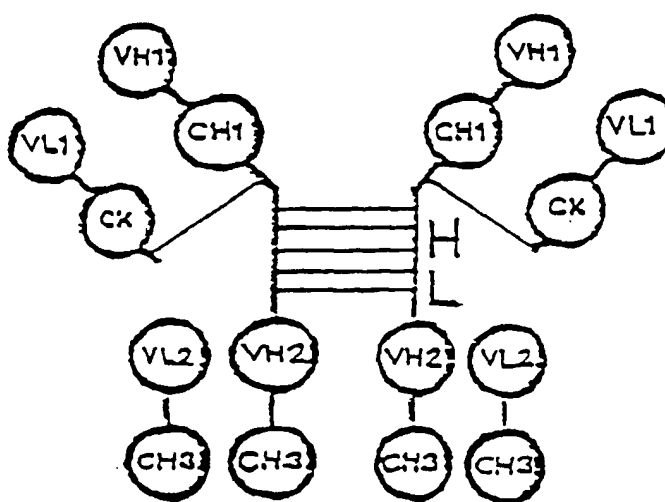
THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. Verfahren nach Anspruch 1 bis Anspruch 6 zur Verwendung als Arzneimittel.
8. Verfahren zur Herstellung von Rezeptoren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die für die schweren Ketten-Antikörperteile kodierenden DNA-Fragmente mittels Linker verbunden und in einem Expressionssystem zusammen mit den Genen für die leichten Ketten exprimiert werden.
9. Verfahren zur Herstellung von bispezifischen, tetravalenten Rezeptoren nach Formel 1, bei denen die C_H3 Domänen durch humane C_H1 Domänen ersetzt werden.

Claims

Claims for the following Contracting States : AT, BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, NL, LU, PT, SE

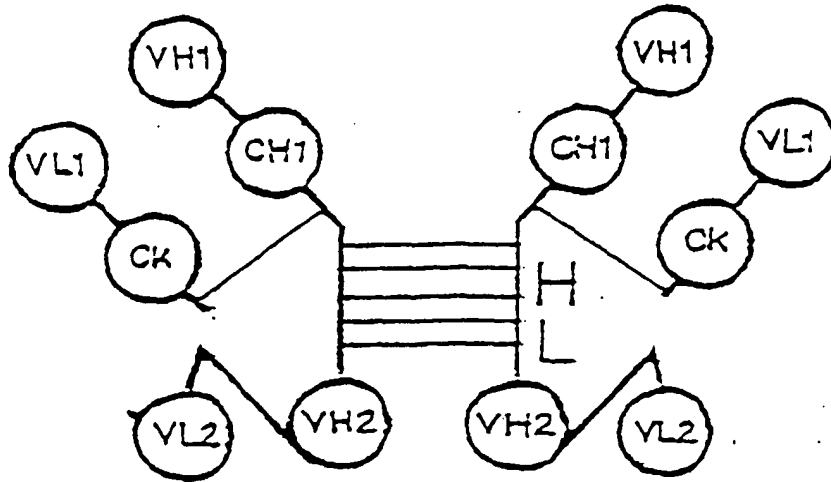
1. A bispecific tetravalent receptor of the formula I



formula I

or formula II

THIS PAGE BLANK (USPTO)



formula II

wherein only the V_L and V_H pairings which belong together are formed and the C_H1 domains are linked to the V_H2 domains via 1 to 10 hinge regions H and a suitable peptide linker L, where the disulfide bridges (thin lines) bring about the dimerization of the bivalent halves of the molecule in the region of the hinge regions.

2. A receptor as claimed in claim 1, wherein one specificity is directed against animal or human tumor-associated antigens.
3. A receptor as claimed in claim 1, wherein one specificity has catalytic or enzymatic activity.
4. A receptor as claimed in claim 1, wherein one specificity is directed against animal or human tumor-associated antigens and the other specificity has catalytic or enzymatic activity.
5. A receptor as claimed in claim 1, wherein one specificity is directed against animal or human tumor-associated antigens and another specificity is directed against a complexon.
6. A receptor as claimed in claim 1, 2, 4 or 5, wherein one specificity derives from the monoclonal antibodies with the variable regions shown in Tab. 2, 3, 4 or 5 having the following sequences:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 2 MAb A

VH

5 Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L
 CAGGTCCAAGTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGAGACTC
 10 20 30 40 50 60
 10 S C A T S G F S D Y Y M N W V R Q P P G
 TCCTGCGCAACTTCTGGGTTCAAGTGAATTAATGACTGAGTGGTCCGCGCCAGCCTCCAGGA
 70 80 90 100 110 120
 15 K A L E W L G F I S N K P N G H T T E Y
 AAAGCACTTGAGTGGTGGGTTTATTTCAAACAAACCTAATGGTCACACAACAGAGTAC
 130 140 150 160 170 180
 20 S A S V K G R F T I S R D N S Q S I L Y
 AGTGCATCTGTGAAGGGTCCGTTCCACATCTCCAGAGATAATCCCAAAGCATCCTCTAT
 190 200 210 220 230 240
 25 L Q M N T L R A E D S A T Y Y C A R D K
 CTTCAAATGAACACCTTGAGAGCTGAGGACAGTGGCAGTTATTATTGTGCAAGAGATAAG
 250 260 270 280 290 300
 30 G I R W Y F D V W G Q G T T V T V S S
 GGAATACGATGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAAGGACACGGTCACCGTCTCCTCA
 310 320 330 340 350

VK

35 A I L S A S P G E K V T M T C R A S S S
 AGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAATGACTTCAGGGCCAGCTCAAG
 10 20 30 40 50 60
 40 V S Y M H W Y Q Q K P G S S P K P W I Y
 TGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACCTGGATTTA
 70 80 90 100 110 120
 45 A T S N L A S G V P A R F S G S G S G T
 TGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
 130 140 150 160 170 180
 50 S Y S L T I I R V E A E D A A T Y Y C Q
 CTCTTACTCTCTCAATCATCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA
 190 200 210 220 230 240
 55 Q W S S N P L T F G A G T K L E I
 GCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGATC
 250 260 270 280 290

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 3 MAb B
VH

5 L Q E S G P D L V K P S Q S L S L T C T
CTGCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAACCTTCTCAGTCACCTTCACTCACCTGCACT
10 20 30 40 50 60

10 V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P G
GTCACCTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGA
70 80 90 100 110 120

15 N K L E W M G Y I Q Y S G I T N Y N P S
AACAACTGGAATGGATGGGCTACATACAGTACAGTGGTATCACTAACTACAACCCCTCT
130 140 150 160 170 180

20 L K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q L
CTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTCCTGCAGTTG
190 200 210 220 230 240

25 N S V T T E D T A T Y Y C A R E D Y D Y
AATTCAGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGAAGACTATGATTAC
250 260 270 280 290 300

30 H W Y F D V W G A G T T V T V S S
CACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
310 320 330 340 350

VK

35 L T Q S P A I M S A S L G E E I T L T C
CTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGAGATCACCCCTAACCTGC
10 20 30 40 50 60

40 S T S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
AGTACCAGCTCGAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTTCTCCC
70 80 90 100 110 120

45 K L L I Y S T S N L A S G V P S R F S G
AAACTCTTGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCAGTGGC
130 140 150 160 170 180

50 S G S G T F Y S L T I S S V E A E D A A
AGTGGGTCTGGGACCTTTTATTCTCTCACAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCC
190 200 210 220 230 240

55 D Y Y C H Q W S S Y P T F G G G T K L E
GATTATTACTGCCATCAGTGGAGTAGTTATCCACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGCAG
250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 4 Mab C

VE

5 Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K M
 CAGGTCCTCAACTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATG
 10 20 30 40 50 60
 10 S C K A S G Y T F T Y Y V I H W V K Q K
 TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTTACTATGTTATTCAGTGGGTGAAACAGAAG
 70 80 90 100 110 120
 15 P G Q G L E W I G Y I H P Y N A G T E Y
 CCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATACATTCCTTACAATGCTGGTACTGAGTAC
 130 140 150 160 170 180
 20 N E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y
 AATGAGAAGTTCAAAGGCCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC
 190 200 210 220 230 240
 25 M E L S S L T S E D S A V Y Y C S M G R
 ATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAATGGGACGA
 250 260 270 280 290 300
 30 G G D Y W G Q G T T V T V S S
 GGGGTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
 310 320 330 340

VK

35 L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C
 CTGACCCAGTCTCCAGCAATTATGTCTGCATCTCCTGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC
 10 20 30 40 50 60
 40 S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
 AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCC
 70 80 90 100 110 120
 45 K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G
 AAAAGATGGATTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC
 130 140 150 160 170 180
 50 S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A
 AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCC
 190 200 210 220 230 240
 55 T Y Y C Q Q W S S N P F T F G A G T K L
 ACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTTCGGCGGGGGACCAAGCTG
 250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 5 Mab D
VH

5 A E S G P G L V R L T S L S I T C T V S
GCAGAGTCAGGGCCTGGCCTGGTGCGCCTCAGCAGCCTGTCCATCACTTGCACTGTCTCT
10 20 30 40 50 60

10 G F S L I S Y G V H W V R Q P P G K G L
GGCTTTTCATTAATTAGTTATGGTGTACACTGGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTG
70 80 90 100 110 120

15 E W L G V I W A G G S T N Y N S A L M S
GAGTGGCTGGGAGTAATATGGGCAGGTGGAAGCACAAATTATAATTGGGCTCTCATGTCC
130 140 150 160 170 180

20 R L S I S K D N S K S Q V F L K M N S L
AGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTG
190 200 210 220 230 240

25 Q T G D T A I Y Y C A R G G D D Y D G F
CAAAGTGGTGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAGGGGGGATGATTACGATGGGTTT
250 260 270 280 290 300

30 A Y W G Q G T T V T V S S G E S
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTCC
310 320 330 340

VK

35 L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C
CTGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGGCTGTGTGTCAGCAGGAGAGAGGTCATGAGCTGC
10 20 30 40 50 60

40 K S S Q S L L S S T K R K N Y L A W Y Q
AAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAGCAGTACAAAGCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAG
70 80 90 100 110 120

45 Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G
CAGAAACCAGGTGAGTCTCCTAAACTACTGATCTACTGGGCATCCACTCGGGAATCTGGG
130 140 150 160 170 180

50 Y P D R F T G S G S G T D F T L T I S S
GTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT
190 200 210 220 230 240

55 V Q A E D L A V Y Y C K Q S Y N L R A F
GTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAACAATCTTATAATCTTCGGGCGTTC
250 260 270 280 290 300

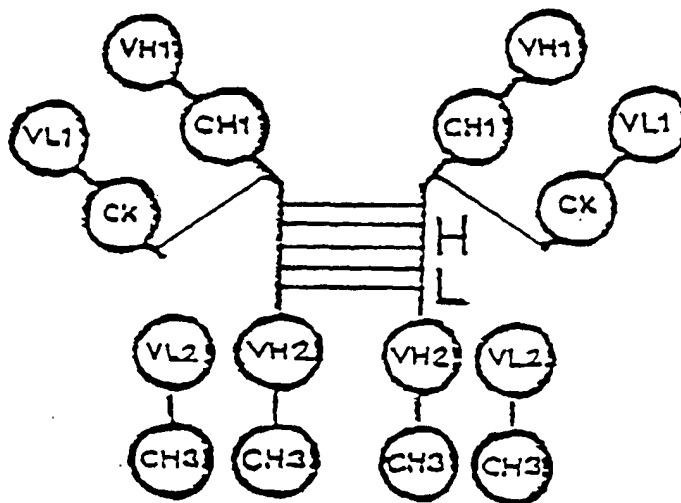
G G G T K L E I K
GGTGGAGGGACCAAGCTGCAGATCAA
310 320

THIS PAGE BLANK (USPTO)

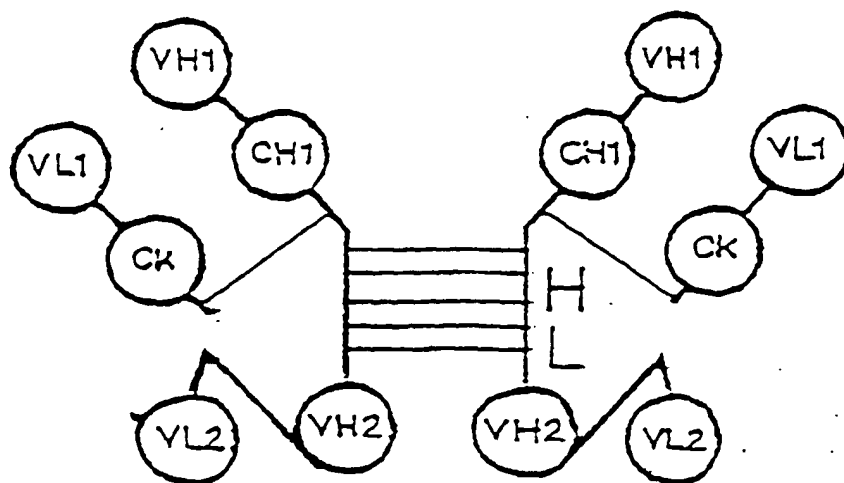
7. A receptor as claimed in claim 1 to claim 6 as pharmaceutical.
8. A process for the preparation of receptors as claimed in claim 1, 2, 3, 4, 5 or 6, which comprises the DNA fragments coding for the heavy chain antibody portions being connected by linkers and expressed in an expression system together with the genes for the light chains.
9. A bispecific tetravalent receptor of the formula I in which the C_{H3} domains are replaced by human C_{H1} domains.

Claims for the following Contracting States : GR, ES

1. A process for the preparation of a bispecific tetravalent receptor of the formula I



or formula II



which comprises only the V_L and V_H pairings which belong together being formed and the C_{H1} domains being linked to the V_{H2} domains via 1 to 10 hinge regions H and a suitable peptide linker L, where the disulfide bridges (thin lines) bring about the dimerization of the bivalent halves of the molecule in the region of the hinge regions.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. The process as claimed in claim 1, wherein one specificity is directed against animal or human tumor-associated antigens.
3. The process as claimed in claim 1, wherein one specificity has catalytic or enzymatic activity.
4. The process as claimed in claim 1, wherein one specificity is directed against animal or human tumor-associated antigens and the other specificity has catalytic or enzymatic activity.
5. The process as claimed in claim 1, wherein one specificity is directed against animal or human tumor-associated antigens and another specificity is directed against a complexon.
6. The process as claimed in claim 1, 2, 4 or 5, wherein one specificity derives from the monoclonal antibodies with the variable regions shown in Tab. 2, 3, 4 or 5 having the following sequences:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 2 MAb A

VE

5 Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L
 CAGGTCCAAGTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGAGACTC
 10 10 20 30 40 50 60
 10 S C A T S G F S D Y Y M N W V R Q P P G
 TCCTGCGCAACTTCTGGGTTCACTGATTACTACATGAACTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGA
 70 80 90 100 110 120
 15 K A L E W L G F I S N K P N G H T T E Y
 AAAGCACTTGAGTGGTTGGGTTTTATTTCAAACAAACCTAATGGTCACACAACAGAGTAC
 130 140 150 160 170 180
 20 S A S V K G R F T I S R D N S Q S I L Y
 AGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTAT
 190 200 210 220 230 240
 25 L Q M N T L R A E D S A T Y Y C A R D K
 CTTCAAATGAACACCCCTGACAGCTGAGGACAGTGCCACTTATTATTGTGCAAGAGATAAG
 250 260 270 280 290 300
 30 G I R W Y F D V W G Q G T T V T V S S
 GGAATACGATGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCA
 310 320 330 340 350

VK

35 A I L S A S P G E K V T M T C R A S S S
 AGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGACGGGCCAGCTCAAG
 10 20 30 40 50 60
 40 V S Y M H W Y Q Q K P G S S P K P W I Y
 TGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACCCCTGGATTTA
 70 80 90 100 110 120
 45 A T S N L A S G V P A R F S G S G S G T
 TGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGCCAGTGGGTCTGGGAC
 130 140 150 160 170 180
 50 S Y S L T I I R V E A E D A A T Y Y C Q
 CTCTTACTCTCTCACAATCATCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA
 190 200 210 220 230 240
 55 Q W S S N P L T F G A G T K L E I
 GCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTGGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGATC
 250 260 270 280 290

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 3 MAb B
VH

5 L Q E S G P D L V K P S Q S L S L T C T
 CTGCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCCT
 10 20 30 40 50 60

 10 V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P G
 GTCAGTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGA
 70 80 90 100 110 120

 15 N K L E W M G Y I Q Y S G I T N Y N P S
 AACAACTGGAATGGATGGGCTACATACAGTACAGTGGTATCACTAACTACAACCCCTCT
 130 140 150 160 170 180

 20 L K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q L
 CTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTG
 190 200 210 220 230 240

 25 N S V T T E D T A T Y Y C A R E D Y D Y
 AATTCAGTCACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGAAGACTATGATTAC
 250 260 270 280 290 300

 30 H W Y F D V W G A G T T V T V S S
 CACTGGTACTTCCATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
 310 320 330 340 350

VK

35 L T Q S P A I M S A S L G E E I T L T C
 CTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGAGATCACCTTAACCTGC
 10 20 30 40 50 60

 40 S T S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
 AGTACCAGCTCGAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCAGTCTCTCCC
 70 80 90 100 110 120

 45 K L L I Y S T S N L A S G V P S R F S G
 AAACCTCTTGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCAGTGGC
 130 140 150 160 170 180

 50 S G S G T F Y S L T I S S V E A E D A A
 AGTGGGTCTGGGACCTTTTATTCTCTCACAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCC
 190 200 210 220 230 240

 55 D Y Y C H Q W S S Y P T F G G G T K L E
 GATTATTACTGCCATCAGTGGAGTAGTTATCCACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGCAG
 250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 4 MAb C

VE

5 Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K M
CAGGTCCAACCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATG
10 20 30 40 50 60

10 S C K A S G Y T F T Y Y V I H W V K Q K
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTTACTATGTTATTCAGTGGGTGAAACAGAAG
70 80 90 100 110 120

15 P G Q G L E W I G Y I H P Y N A G T E Y
CCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATACATTCACTTACAATGCTGGTACTGAGTAC
130 140 150 160 170 180

20 N E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y
AATGAGAAGTTCAAAGGCCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCAGAGCCTAC
190 200 210 220 230 240

25 M E L S S L T S E D S A V Y Y C S M G R
ATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAATGGGACGA
250 260 270 280 290 300

30 G G D Y W G Q G T T V T V S S
GGGGGTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
310 320 330 340

VK

35 L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C
CTGACCCAGTCTCCAGCAATTATGCTGTCATCTCCTGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC
10 20 30 40 50 60

40 S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCC
70 80 90 100 110 120

45 K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G
AAAAGATGCAATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC
130 140 150 160 170 180

50 S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A
AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCC
190 200 210 220 230 240

55 T Y Y C Q Q W S S N P F T F G A G T K L
ACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTCCGGCGGGGGACCAAGCTG
250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tab. 5 Mab D
VH

5 A E S G P G L V R L T S L S I T C T V S
GCAGAGTCAGGGCCTGGCCTGGTGCGCCTCAGGAGCCTGTCCATCACTTGCCTGTCTCT
10 20 30 40 50 60

10 G F S L I S Y G V H W V R Q P P G K G L
GGCTTTTCATTAAATTAGTTATGGTGTACACTGGGTTCCGCCAGCCTCCAGCAAAGGGTCTG
70 80 90 100 110 120

15 E W L G V I W A G G S T N Y N S A L M S
GAGTGGCTGGGAGTAATATGGGCAGGTGGAAGCACAAATTATAATTGGGCTCTCATGTCC
130 140 150 160 170 180

20 R L S I S K D N S K S Q V F L K M N S L
AGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGCCAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTG
190 200 210 220 230 240

25 Q T G D T A I Y Y C A R G G D D Y D G F
CAAACCTGGTGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAGGGGGGATGATTACGATGGGTTT
250 260 270 280 290 300

30 A Y W G Q G T T V T V S S G E S
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTCC
310 320 330 340

VK

35 L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C
CTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTGCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGC
10 20 30 40 50 60

40 K S S Q S L L S S T K R K N Y L A W Y Q
AAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAGCAGTACAAAGCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAG
70 80 90 100 110 120

45 Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G
CAGAAACCAGGTCACTCTCTAAACTACTGATCTACTGGGCATCCACTCGGGAATCTGGG
130 140 150 160 170 180

Y P D R F T G S G S G T D F T L T I S S
GTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT
190 200 210 220 230 240

50 V Q A E D L A V Y Y C K Q S Y N L R A F
GTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAACAATCTTATAATCTTCGGGCGTTC
250 260 270 280 290 300

55 G G G T K L E I K
GGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAA
310 320

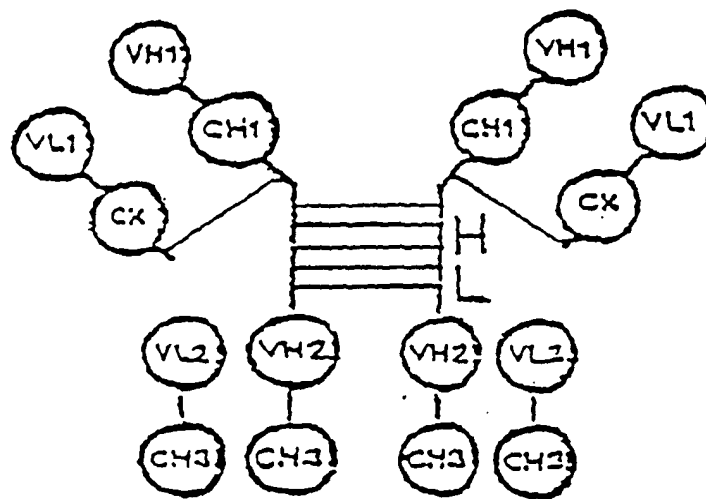
THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. The process as claimed in claim 1 to claim 6 for use as pharmaceutical.
8. A process for the preparation of receptors as claimed in claim 1, 2, 3, 4, 5 or 6, which comprises the DNA fragments coding for the heavy chain antibody portions being connected by linkers and expressed in an expression system together with the genes for the light chains.
9. A process for the preparation of a bispecific tetravalent receptor of the formula I in which the C_H3 domains are replaced by human C_H1 domains.

Revendications

Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, NL, LU, PT, SE

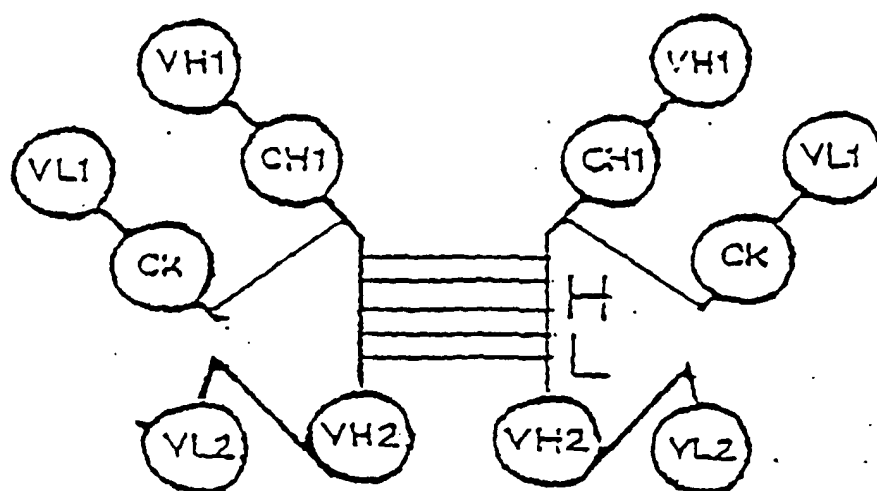
1. Récepteurs tétravalents bispécifiques de formule I



formule I

ou de formule II

THIS PAGE BLANK (USPTO)



formule II

caractérisés en ce que seuls sont formés les appariements V_L et V_H correspondants et les domaines C_H1 sont reliés aux domaines V_H2 par l'intermédiaire de 1 à 10 régions charnières H et d'un leur peptidique L approprié, les ponts disulfure (traits fins) provoquant la dimérisation des demi-molécules divalentes dans la zone des régions charnières.

2. Récepteurs selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'une spécificité est dirigée contre des antigènes humains ou animaux associés à des tumeurs.
3. Récepteurs selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'une spécificité a une activité catalytique ou enzymatique.
4. Récepteurs selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'une spécificité est dirigée contre des antigènes humains ou animaux associés à des tumeurs, et l'autre spécificité a une activité catalytique ou enzymatique.
5. Récepteurs selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'une spécificité est dirigée contre des antigènes humains ou animaux associés à des tumeurs, et une autre spécificité est dirigée contre un complexe.
6. Récepteurs selon la revendication 1, 2, 4 ou 5, caractérisés en ce qu'une spécificité dérive des anticorps monoclonaux comportant les régions variables selon le tableau 2, 3, 4 ou 5, ayant les séquences suivantes:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tableau 2 AcM A

VB

5 Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L
CAGGTCCAACCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACACCTGGGGGTTCTCTGAGACTC
10 20 30 40 50 60

10 S C A T S G F S D Y Y M N W V R Q P P G
TCCTGCGCAACTTCTGGGTTCACTGATTACTACATGAACTGGTCCGCCAGCCTCCAGGA
70 80 90 100 110 120

15 K A L E W L G F I S N K P N G H T T E Y
AAAGCACTTCAGTGGTTGGGTTTTATTTCAAACAAACCTAATGGTCACACAACAGAGTAC
130 140 150 160 170 180

20 S A S V K G R F T I S R D N S Q S I L Y
AGTGCATCTGTGAAGGGTCCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTAT
190 200 210 220 230 240

25 L Q M N T L R A E D S A T Y Y C A R D K
CTTCAATGAACACCTTCAGAGCTGAGGACAGTGGCACTTATTATTGTGCAAGAGATAAG
250 260 270 280 290 300

30 G I R W Y F D V W G Q G T T V T V S S
GGAATACGATGGTACTTCCATGTCTGGGGCCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
310 320 330 340 350

VK

35 A I L S A S P G E K V T M T C R A S S S
AGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAG
10 20 30 40 50 60

40 V S Y M H W Y Q Q K P G S S P K P W I Y
TGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACCTGGATTTA
70 80 90 100 110 120

45 A T S N L A S G V P A R F S G S G S G T
TGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
130 140 150 160 170 180

50 S Y S L T I I R V E A E D A A T Y Y C Q
CTCTTACTCTCTCAATCATCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA
190 200 210 220 230 240

55 Q W S S N P L T F G A G T K L E I
GCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGATC
250 260 270 280 290

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tableau 3 AcM B

VH

5 L Q E S G P D L V K P S Q S L S L T C T
CTGCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCACT
10 20 30 40 50 60

10 V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P G
GTCAGTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGA
70 80 90 100 110 120

15 N K L E W M G Y I Q Y S G I T N Y N P S
AACAACTGGAATGGATGGGCTACATACAGTACAGTGGTATCACTAACTACAACCCCTCT
130 140 150 160 170 180

20 L K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q L
CTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTG
190 200 210 220 230 240

25 N S V T T E D T A T Y Y C A R E D Y D Y
AATTCAGTCACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGAAGACTATGATTAC
250 260 270 280 290 300

30 H W Y F D V W G A G T T V T V S S
CACTGGTACTTTCGATGTCTGGGGCCAGCGACCGTCACCGTCTCCTCA
310 320 330 340 350

VK

35 L T Q S P A I M S A S L G E E I T L T C
CTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGAGATCACCCTAACCTGC
10 20 30 40 50 60

40 S T S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
AGTACCAGCTCGAGTGTAAGTTACATGCAGTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCCTTCTCCC
70 80 90 100 110 120

45 K L L I Y S T S N L A S G V P S R F S G
AAACTCTTGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCAGTGGC
130 140 150 160 170 180

50 S G S G T F Y S L T I S S V E A E D A A
AGTGGGTCTGGGACCTTTTATTCTCTACAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCC
190 200 210 220 230 240

55 D Y Y C H Q W S S Y P T F G G G T K L E
GATTATTACTGCCATCAGTGGAGTAGTTATCCACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAG
250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tableau 4 AcM C

VH

5 Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K M
CAGGTCCAAGTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATG
10 20 30 40 50 60

10 S C K A S G Y T F T Y Y V I H W V K Q K
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTTACTATGTTATTCAGTGGGTGAAACAGAAG
70 80 90 100 110 120

15 P G Q G L E W I G Y I H P Y N A G T E Y
CCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATACATTATCCTTACAATGCTGGTACTGAGTAC
130 140 150 160 170 180

20 N E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y
AATGAGAAGTTCAAAGGCCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCAGCAGCCTAC
190 200 210 220 230 240

25 M E L S S L T S E D S A V Y Y C S M G R
ATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAATGGGACGA
250 260 270 280 290 300

30 G G D Y W G Q G T T V T V S S
GGGGTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
310 320 330 340

VK

35 L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C
CTGACCCAGTCTCCAGCAATTATGTCTGCATCTCCTGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC
10 20 30 40 50 60

40 S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCC
70 80 90 100 110 120

45 K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G
AAAAGATGCATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC
130 140 150 160 170 180

50 S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A
AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCC
190 200 210 220 230 240

55 T Y Y C Q Q W S S N P F T F G A G T K L
ACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTCCGGCGGGGACCAAGCTG
250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tableau 5 AcM D

VH

5 A E S G P G L V R L T S L S I T C T V S
GCAGAGTCAGGGCCTGGCCTGGTGGCGCTCACGAGCCTGTCCATCACTTGCCTGTCTCT
10 10 20 30 40 50 60

10 G F S L I S Y G V H W V R Q P P G K G L
GGCTTTTCATTAAATTAGTTATGGTGTACACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTG
70 80 90 100 110 120

15 E W L G V I W A G G S T N Y N S A L M S
GAGTGGCTGGGAGTAATATGGGCAGGTGGAAGCACAAATTATAATTCGGCTCTCATGTCC
130 140 150 160 170 180

20 R L S I S K D N S K S Q V F L K M N S L
AGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTG
190 200 210 220 230 240

25 Q T G D T A I Y Y C A R G G D D Y D G F
CAAACCTGGTGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAGGGGGGATGATTACGATGGGTTT
250 260 270 280 290 300

30 A Y W G Q G T T V T V S S G E S
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTCC
310 320 330 340

VK

35 L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C
CTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGC
10 20 30 40 50 60

40 K S S Q S L L S S T K R K N Y L A W Y Q
AAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAGCAGTACAAAGCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAG
70 80 90 100 110 120

45 Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G
CAGAAACCAGGTCACTCTCTAACTACTGATCTACTGGGCATCCACTCGGGAATCTGGG
130 140 150 160 170 180

50 Y P D R F T G S G S G T D F T L T I S S
GTCCCTGATCGTTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT
190 200 210 220 230 240

55 V Q A E D L A V Y Y C K Q S Y N L R A F
GTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAACAATCTTATAATCTTCGGGCGTTC
250 260 270 280 290 300

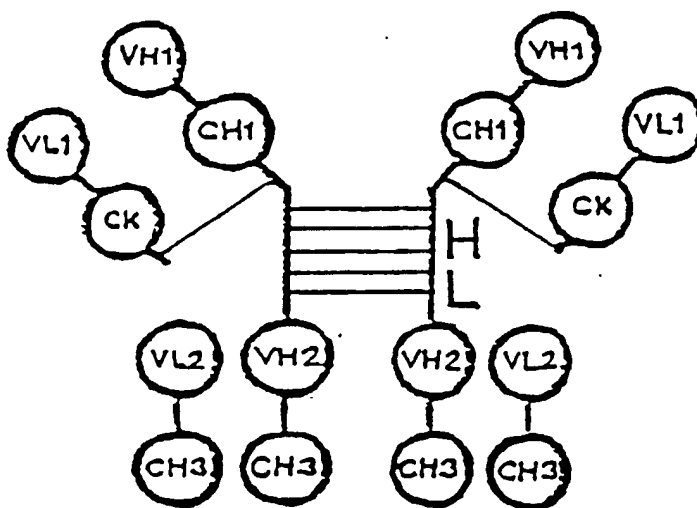
G G G T K L E I K
GGTGGAGGGACCAAGCTCGAGATCAA
310 320

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. Récepteurs selon les revendications 1 à 6, en tant que médicaments.
8. Procédé pour la production de récepteurs selon la revendication 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caractérisé en ce que les fragments d'ADN codant pour les segments d'anticorps de type chaîne lourde sont assemblés au moyen de lieurs et exprimés dans un système d'expression, conjointement avec les gènes codant pour les chaînes légères.
9. Récepteurs tétravalents bispécifiques de formule I, dans lesquels les domaines C_H3 sont remplacés par des domaines C_H1 humains.

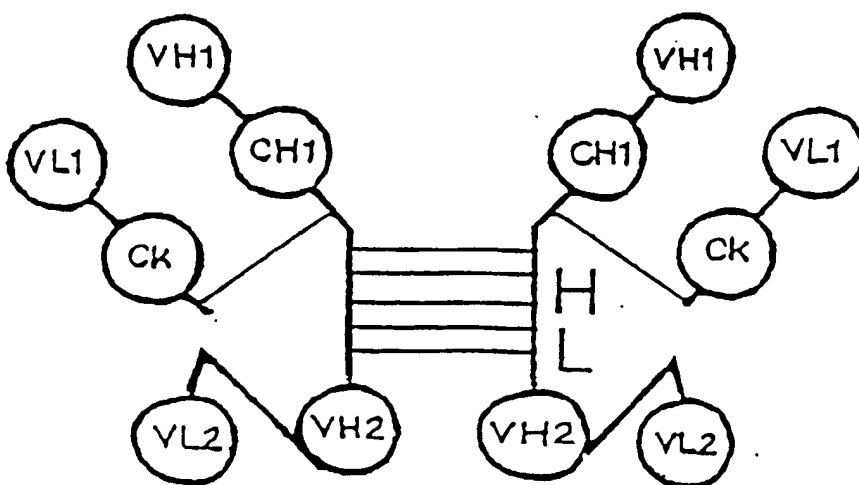
Revendications pour les Etats contractants suivants : GR, ES

1. Procédé pour la production de récepteurs tétravalents bispécifiques de formule I



formule I

ou de formule II



formule II

THIS PAGE BLANK (USPTO)

caractérisés en ce que seuls sont formés les appariements V_L et V_H correspondants et les domaines C_H1 sont reliés aux domaines V_H2 par l'intermédiaire de 1 à 10 régions charnières H et d'un lieu peptidique L approprié, les ponts disulfure (traits fins) provoquant la dimérisation des demi-molécules divalentes dans la zone des régions charnières.

5

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'une spécificité est dirigée contre des antigènes humains ou animaux associés à des tumeurs.

10

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'une spécificité a une activité catalytique ou enzymatique.
4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'une spécificité est dirigée contre des antigènes humains ou animaux associés à des tumeurs, et l'autre spécificité a une activité catalytique ou enzymatique.

15

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'une spécificité est dirigée contre des antigènes humains ou animaux associés à des tumeurs, et une autre spécificité est dirigée contre un complexon.
6. Procédé selon la revendication 1, 2, 4 ou 5, caractérisé en ce qu'une spécificité dérive des anticorps monoclonaux comportant les régions variables selon le tableau 2, 3, 4 ou 5, ayant les séquences suivantes:

20

25

30

35

40

45

50

55

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tableau 2 AcM A

VH

5 Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L
CAGGTCCACTGCAGGAGTCTGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGTTCTCTGAGACTC
10 20 30 40 50 60

10 S C A T S G F S D Y Y M N W V R Q P P G
TCCTGCGCAACTTCTGGGTTCACTGATTACTACATGAAGTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGA
70 80 90 100 110 120

15 K A L E W L G F I S N K P N G H T T E Y
AAAGCACTTGAGTGGTTGGGTTTTATTTCAAACAAACCTAATGGTCACACAACAGAGTAC
130 140 150 160 170 180

20 S A S V K G R F T I S R D N S Q S I L Y
AGTGCATCTGTGAAGGGTCCGTTCCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTAT
190 200 210 220 230 240

25 L Q M N T L R A E D S A T Y Y C A R D K
CTTCAAATGAACACCCTGAGAGCTGAGGACAGTGCCACTTATTATTGTGCAAGAGATAAG
250 260 270 280 290 300

30 G I R W Y E D V W G Q G T T V T V S S
GGAATACGATGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
310 320 330 340 350

VK

35 A I L S A S P G E K V T M T C R A S S S
AGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTCCAGGGCCAGCTCAAG
10 20 30 40 50 60

40 V S Y M H W Y Q Q K P G S S P K P W I Y
TGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCCTGCATTTA
70 80 90 100 110 120

45 A T S N L A S G V P A R F S G S G S G T
TGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
130 140 150 160 170 180

50 S Y S L T I I R V E A E D A A T Y Y C Q
CTCTTACTCTCTCAATCATCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA
190 200 210 220 230 240

55 Q W S S N P L T F G A G T K L E I
GCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTGGAGATC
250 260 270 280 290

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tableau 3 ACM B

VR

L Q E S G P D L V K P S Q S L S L T C T
 CTGCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAACCTTCTCAGTCACCTTTCACCTCACCTGCACT
 10 20 30 40 50 60

V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P G
 GTCAGTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGCCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGA
 70 80 90 100 110 120

N K L E W M G Y I Q Y S G I T N Y N P S
 AACAACTGGAATGGATGGGCTACATACAGTACAGTGGTATCACTAACTACAACCCCTCT
 130 140 150 160 170 180

L K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q L
 CTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCACTTG
 190 200 210 220 230 240

N S V T T E D T A T Y Y C A R E D Y D Y
 AATTCAGTCACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGAAGACTATGATTAC
 250 260 270 280 290 300

H W Y F D V W G A G T T V T V S S
 CACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
 310 320 330 340 350

VK

L T Q S P A I M S A S L G E E I T L T C
 CTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGAGATCACCCCTAACCTGC
 10 20 30 40 50 60

S T S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
 AGTACCAGCTCGAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTTCTCCC
 70 80 90 100 110 120

K L L I Y S T S N L A S G V P S R E S G
 AAACCTCTTGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCAGTGGC
 130 140 150 160 170 180

S G S G T F Y S L T I S S V E A E D A A
 AGTGCCTCTGGGACCTTTTATTCTCTCACAATCAGCAGTGTGGAGGCTCAAGATGCTGCC
 190 200 210 220 230 240

D Y Y C H Q W S S Y P T F G G G T K L E
 GATTATTACTGCCATCAGTGGAGTAGTTATCCACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAG
 250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tableau 4 AcM C

VH

5 Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K M
CAGGTCCAAGTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATG
10 20 30 40 50 60

10 S C K A S G Y T F T Y Y V I H W V K Q K
TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTTACTATGTTATTCACTGGGTGAAACAGAAG
70 80 90 100 110 120

15 P G Q G L E W I G Y I H P Y N A G T E Y
CCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATACATTCACTTACAATGCTGGTACTCAGTAC
130 140 150 160 170 180

20 N E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y
AATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCAGCAGCTAC
190 200 210 220 230 240

25 M E L S S L T S E D S A V Y Y C S M G R
ATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAATGGGACGA
250 260 270 280 290 300

30 G G D Y W G Q G T T V T V S S
GGGGTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
310 320 330 340

VK

35 L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C
CTGACCCAGTCTCCAGCAATTATGTCTGCATCTCCTGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC
10 20 30 40 50 60

40 S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P
AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCC
70 80 90 100 110 120

45 K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G
AAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC
130 140 150 160 170 180

50 S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A
AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCC
190 200 210 220 230 240

55 T Y Y C Q Q W S S N P F T F G A G T K L
ACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTCCGGCGGGGACCAAGCTG
250 260 270 280 290 300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tableau 5 AcM D

VH

5 A E S G P G L V R L T S L S I T C T V S
GCAGAGTCAGGGCCTGGCTGGTGGCCTCAGGAGCCTGTCCATCACTTGCACTGTCTCT
10 10 20 30 40 50 60

10 G F S L I S Y G V H W V R Q P P G K G L
GGCTTTTCATTAATTAGTTATGGTGTACACTGGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTG
70 80 90 100 110 120

15 E W L G V I W A G G S T N Y N S A L M S
GAGTGGCTGCGAGTAATATGGGCAGGTGGAAGCACAAATTATAATTTCGGCTCTCATGTCC
130 140 150 160 170 180

20 R L S I S K D N S K S Q V F L K M N S L
AGACTGAGCATCAGCAAAGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTG
190 200 210 220 230 240

25 Q T G D T A I Y Y C A R G G D D Y D G F
CAAACCTGGTGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAGGGGGGATGATTACGATGGGTTT
250 260 270 280 290 300

30 A Y W G Q G T T V T V S S G E S
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTCC
310 320 330 340

VK

35 L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C
CTEACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGC
10 20 30 40 50 60

40 K S S Q S L L S S T K R K N Y L A W Y Q
AAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAGCAGTACAAAGCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAG
70 80 90 100 110 120

45 Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G
CAGAAACCAGGTCACTCTCCTAAACTACTGATCTACTGGGCATCCACTCGGGAATCTGGG
130 140 150 160 170 180

Y P D R F T G S G S G T D F T L T I S S
GTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGT
190 200 210 220 230 240

50 V Q A E D L A V Y Y C K Q S Y N L R A F
GTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAACAATCTTATAATCTTCGGGCGTTT
250 260 270 280 290 300

G G G T K L E I K
GGTGGAGGGACCAAGCTGCAGATCAAA
310 320

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. Procédé selon les revendications 1 à 6, pour utilisation des récepteurs en tant que médicaments.
8. Procédé pour la production de récepteurs selon la revendication 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caractérisé en ce que les fragments d'ADN codant pour les segments d'anticorps de type chaîne lourde sont assemblés au moyen de lieurs et exprimés dans un système d'expression, conjointement avec les gènes codant pour les chaînes légères.
9. Procédé pour la production de récepteurs tétravalents bispécifiques de formule I, dans lesquels les domaines C_H3 sont remplacés par des domaines C_H1 humains.

10

15

20

25

30

35

40

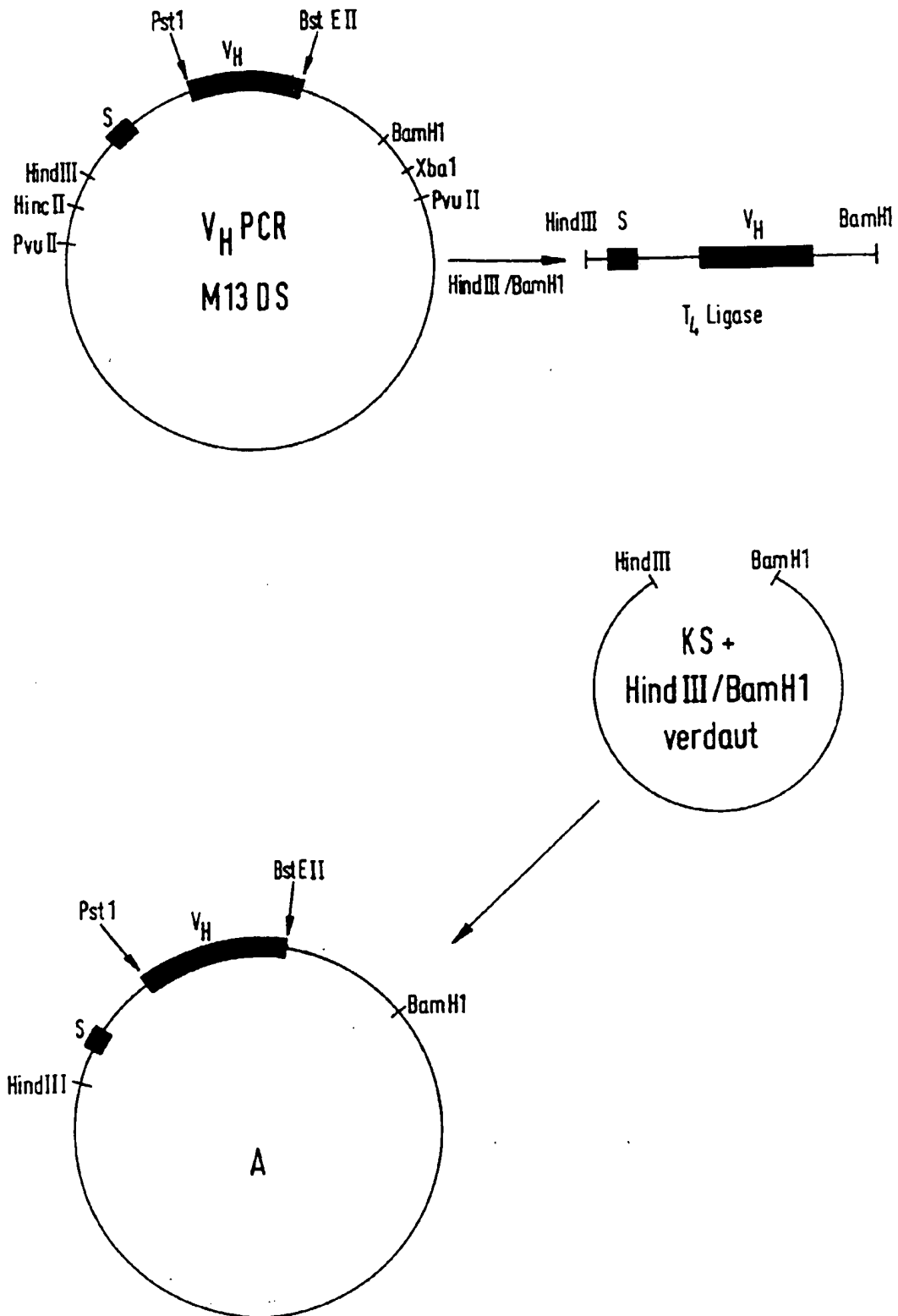
45

50

55

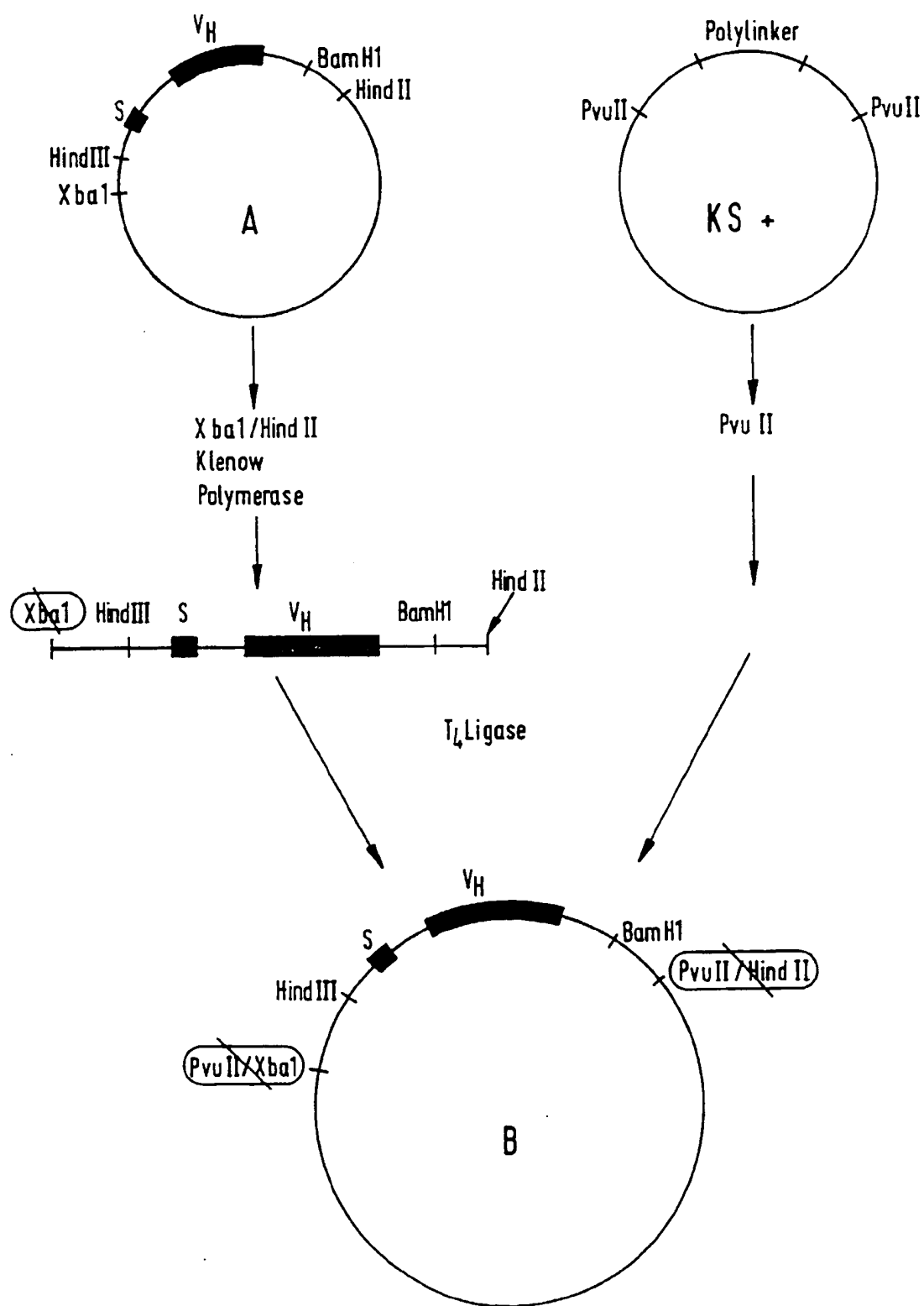
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.1



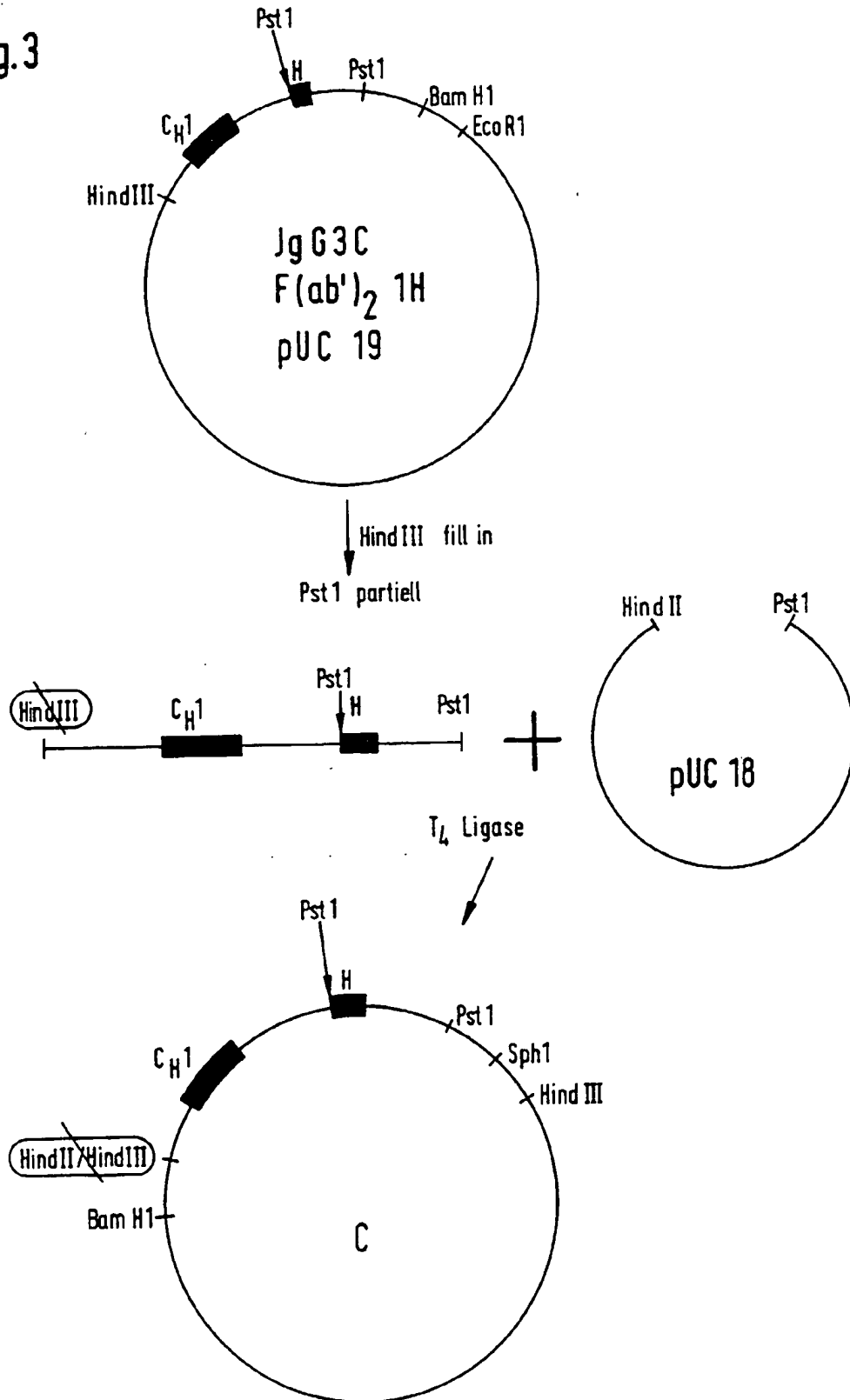
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.2



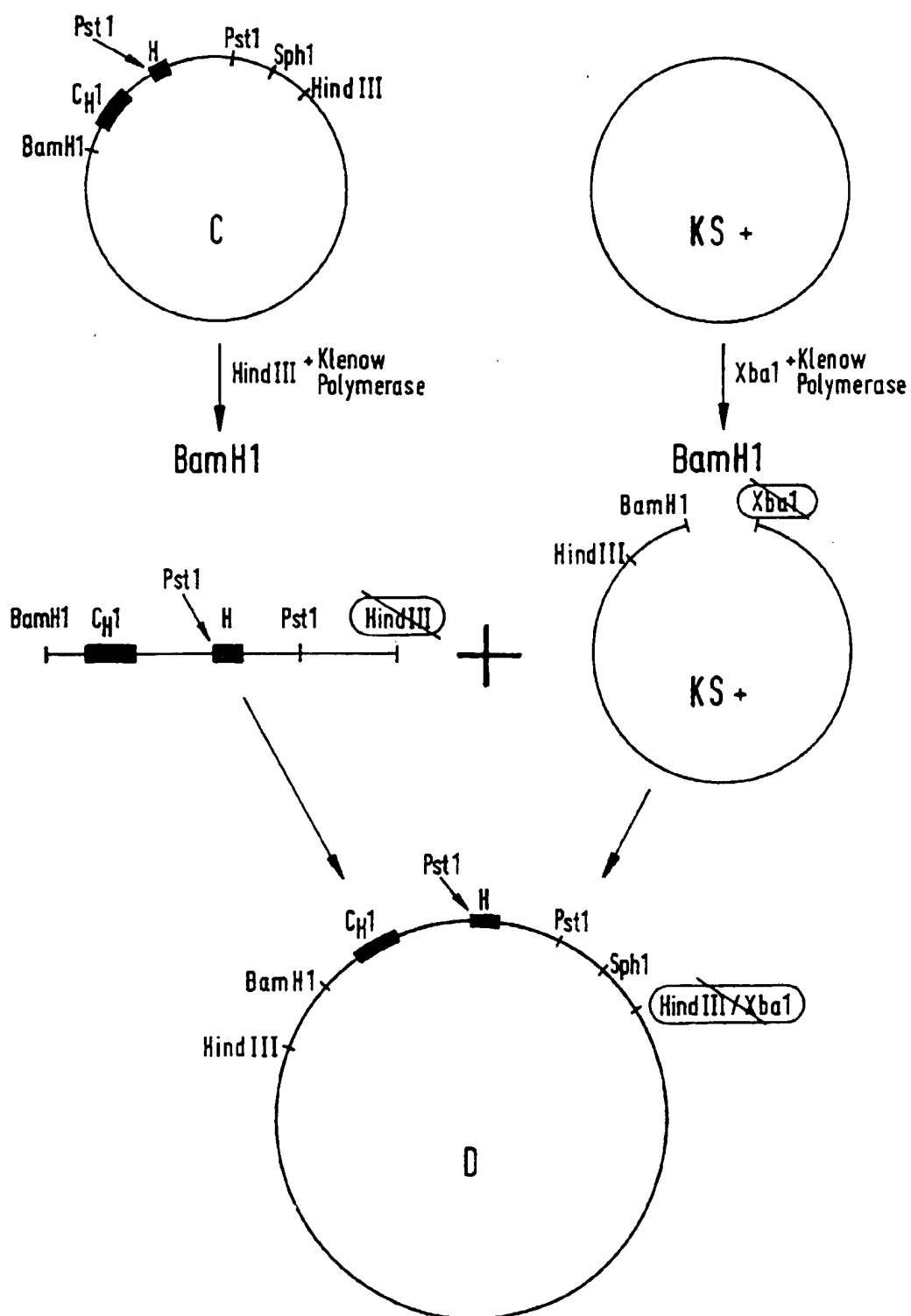
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 3



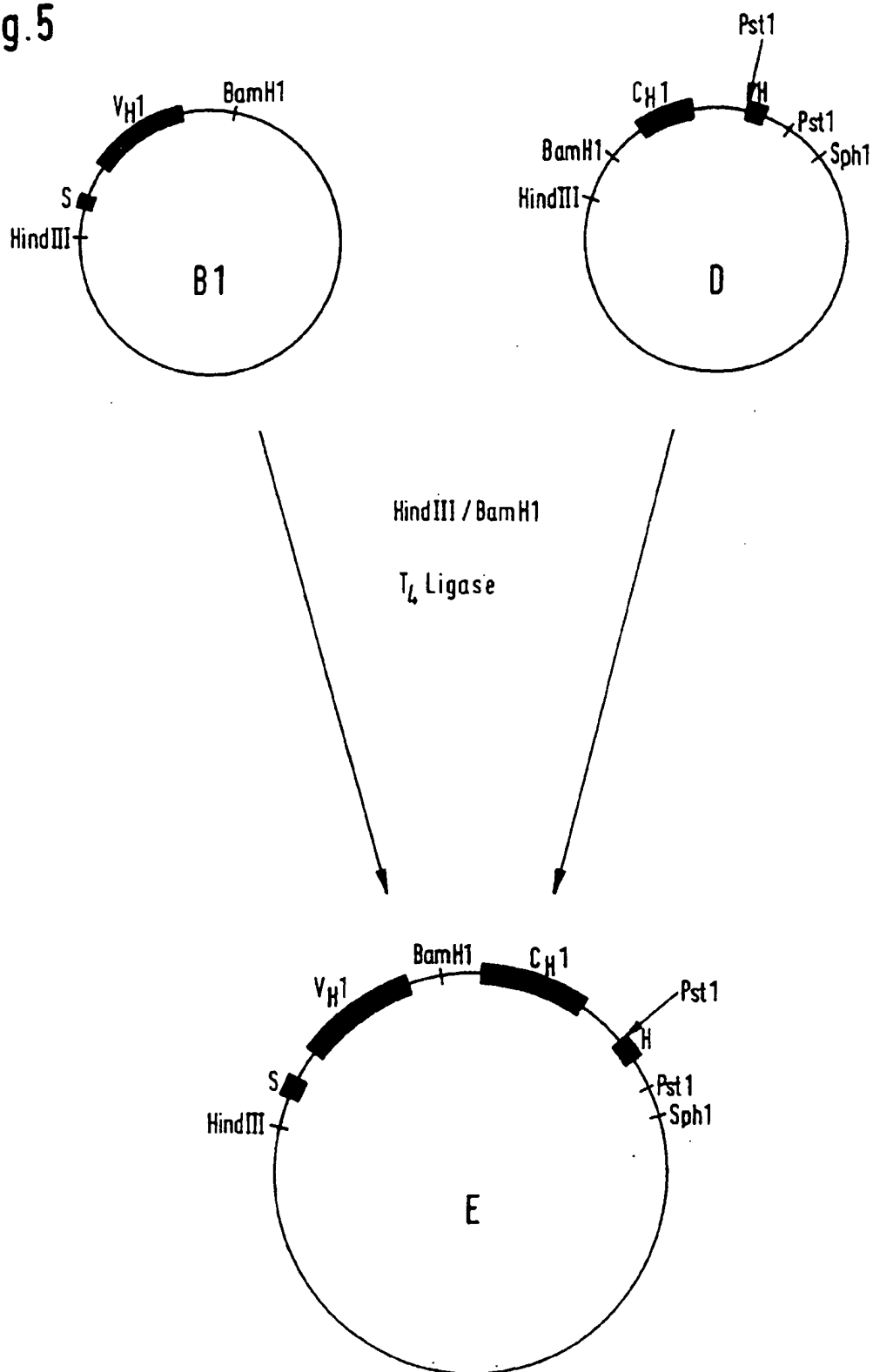
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.4



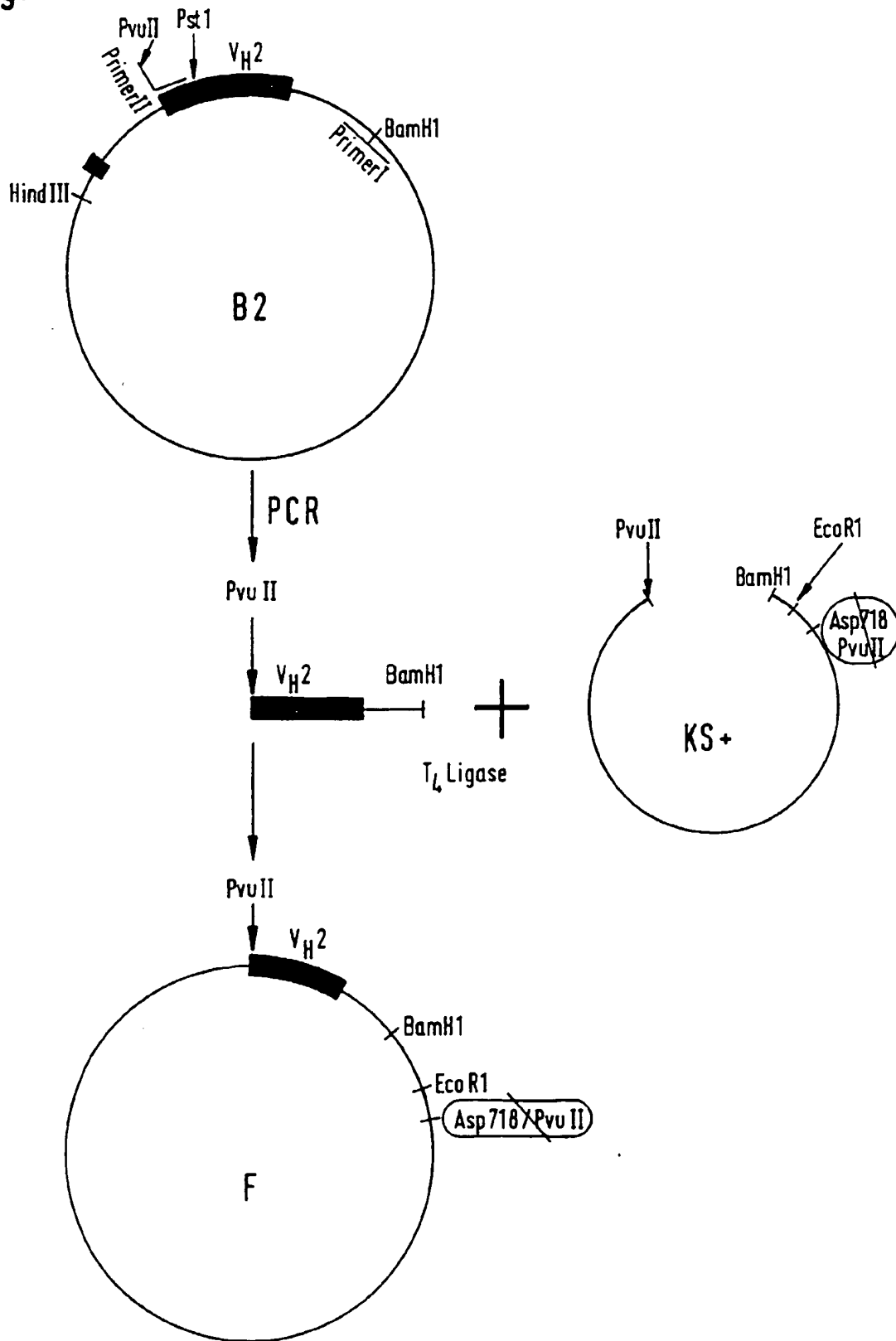
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 5



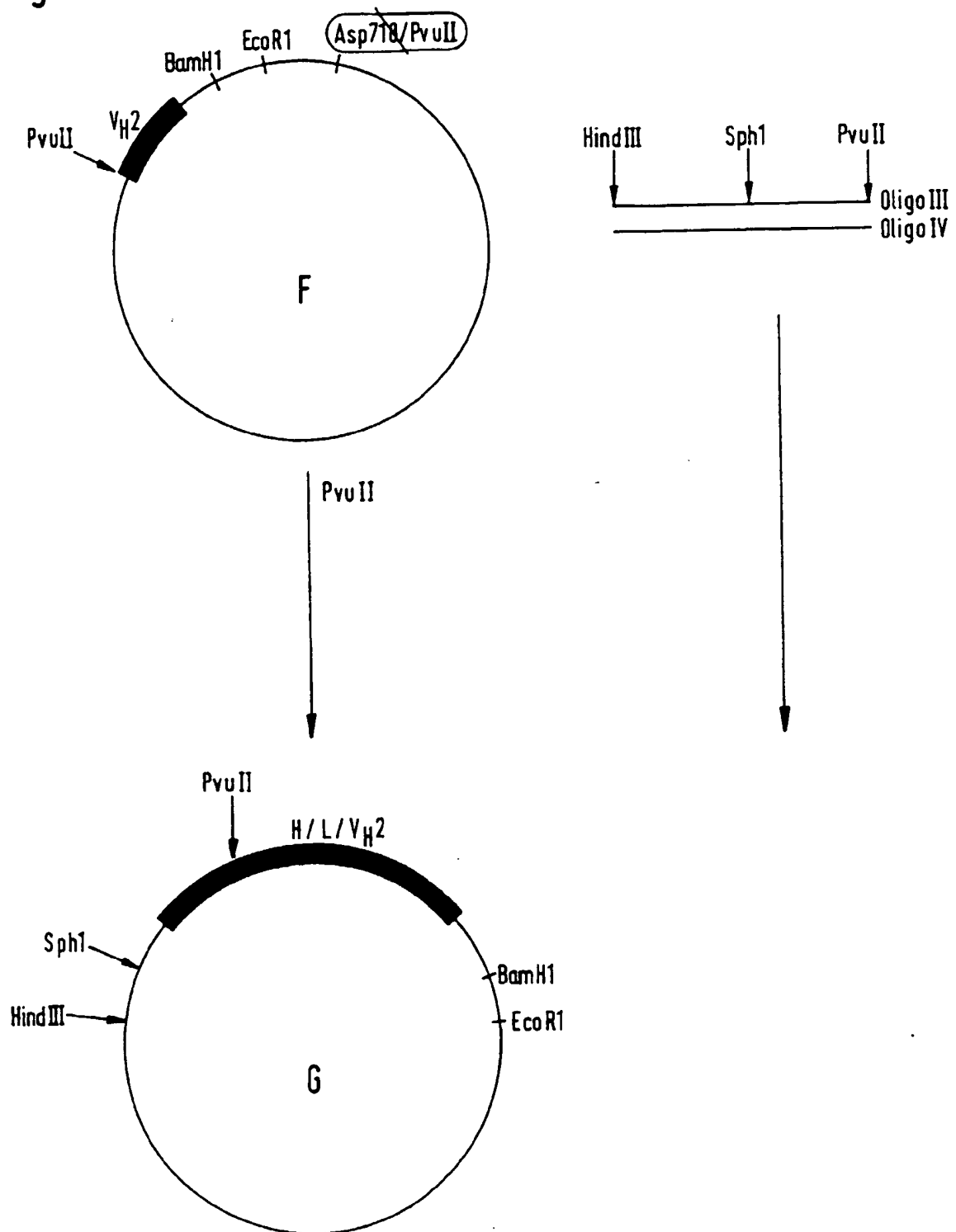
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 6



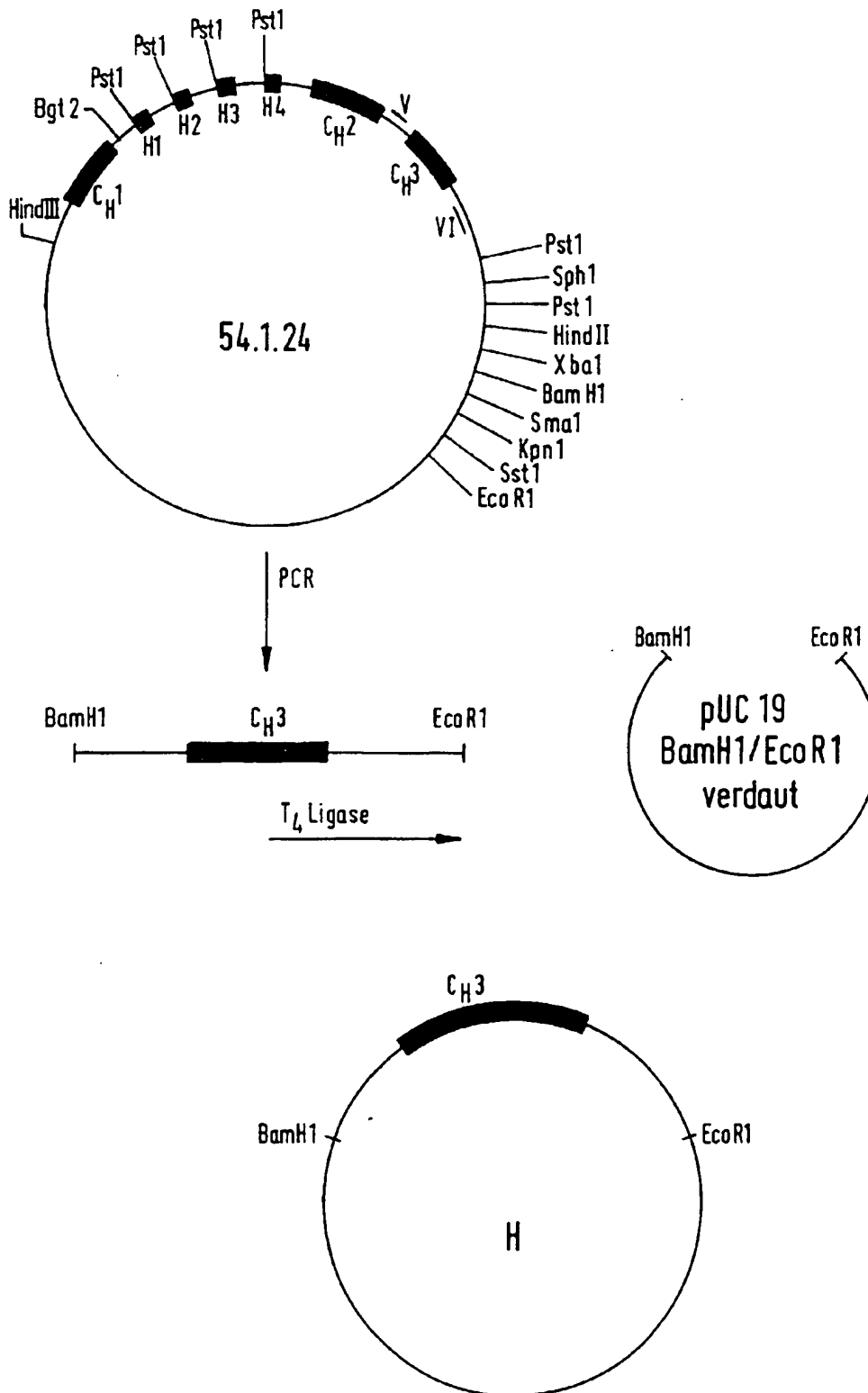
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.7



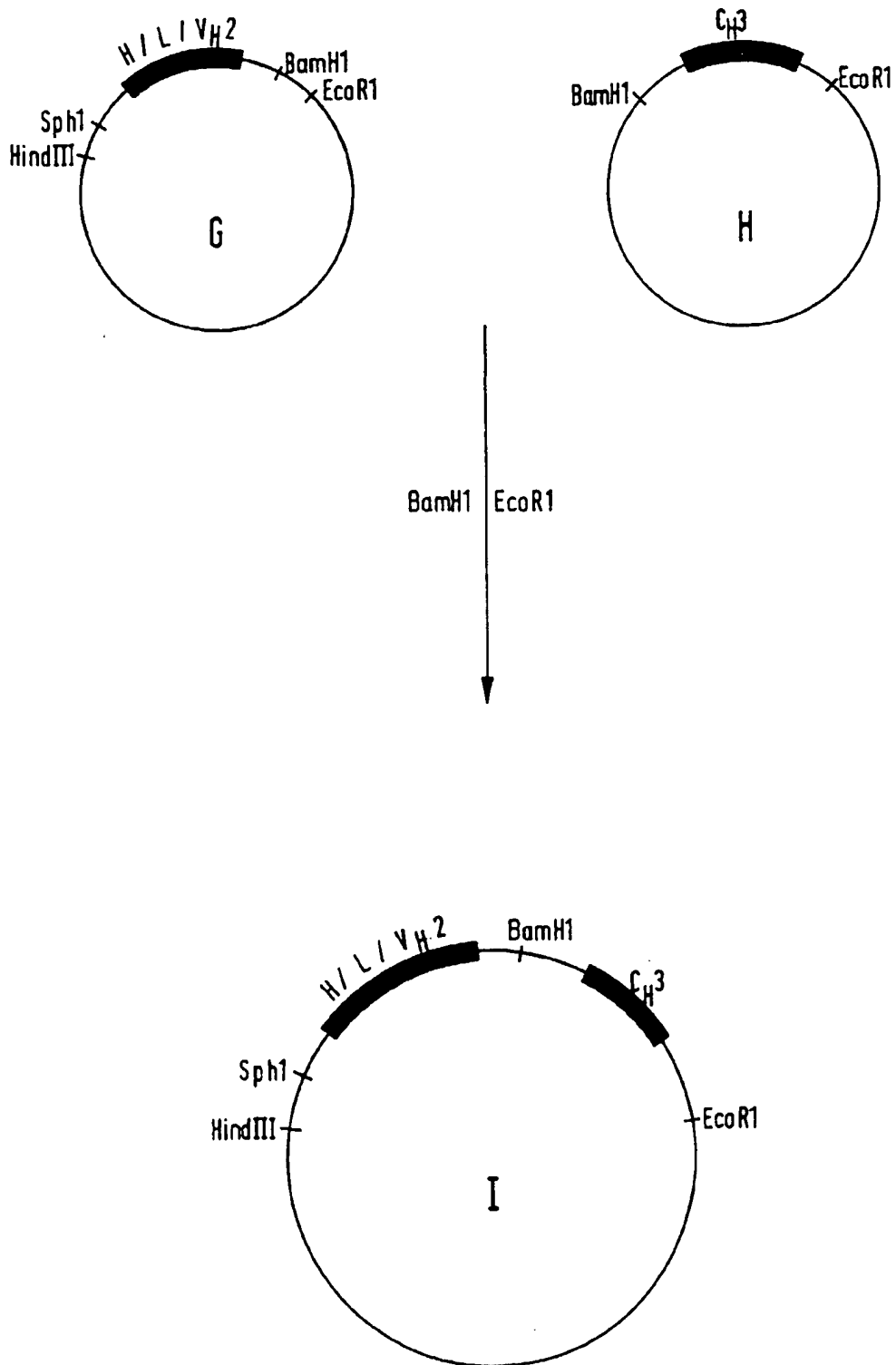
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.8



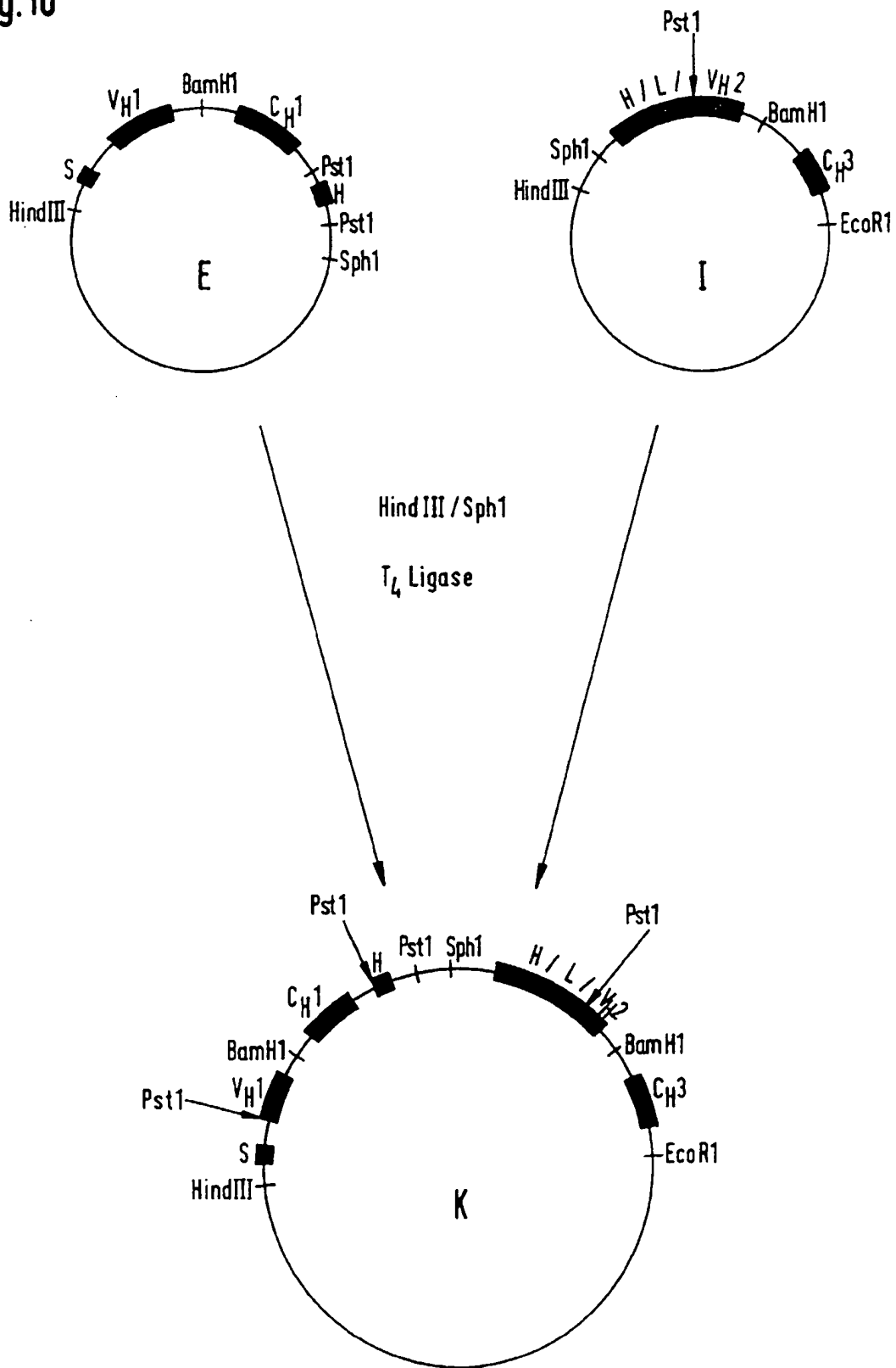
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.9



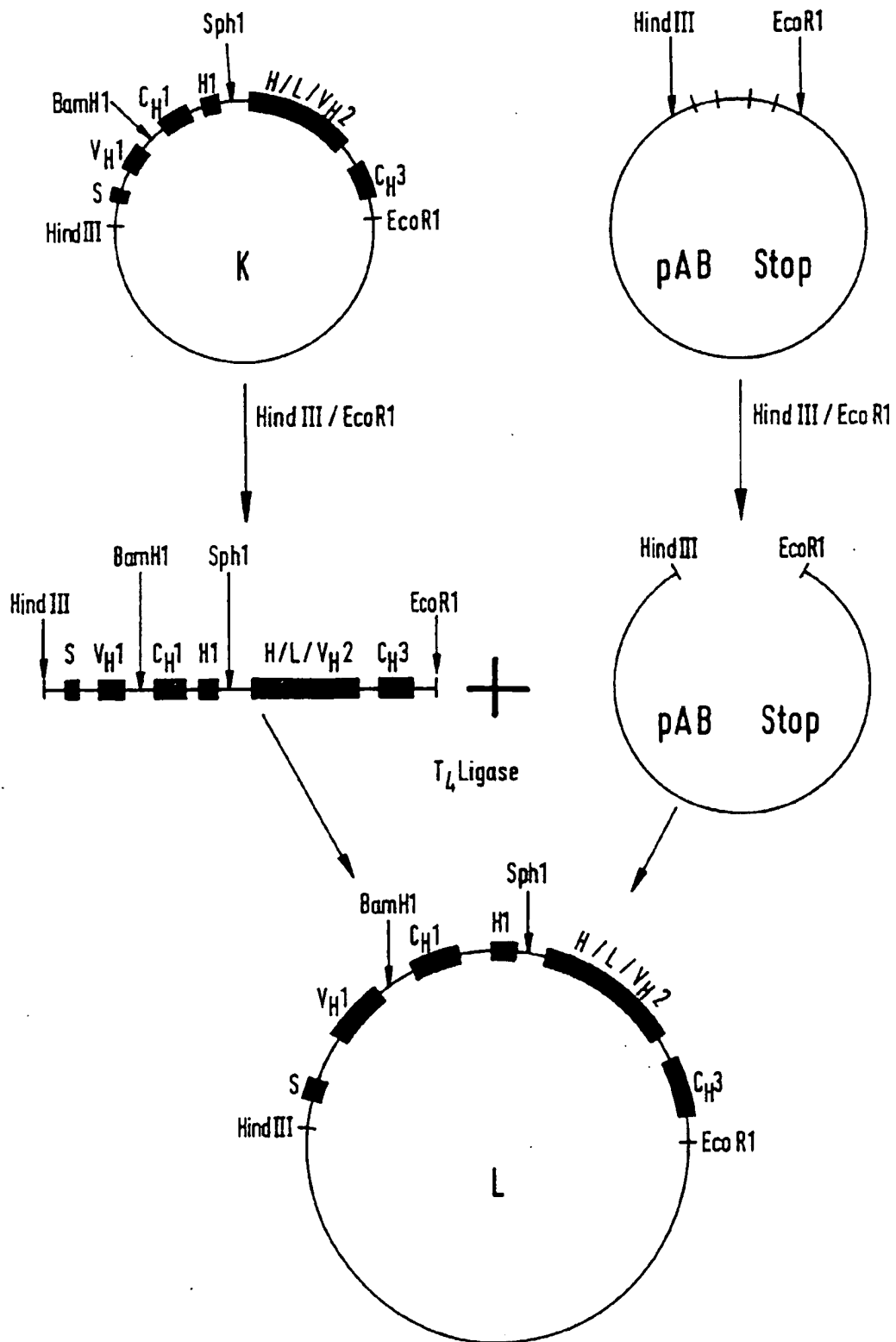
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.10



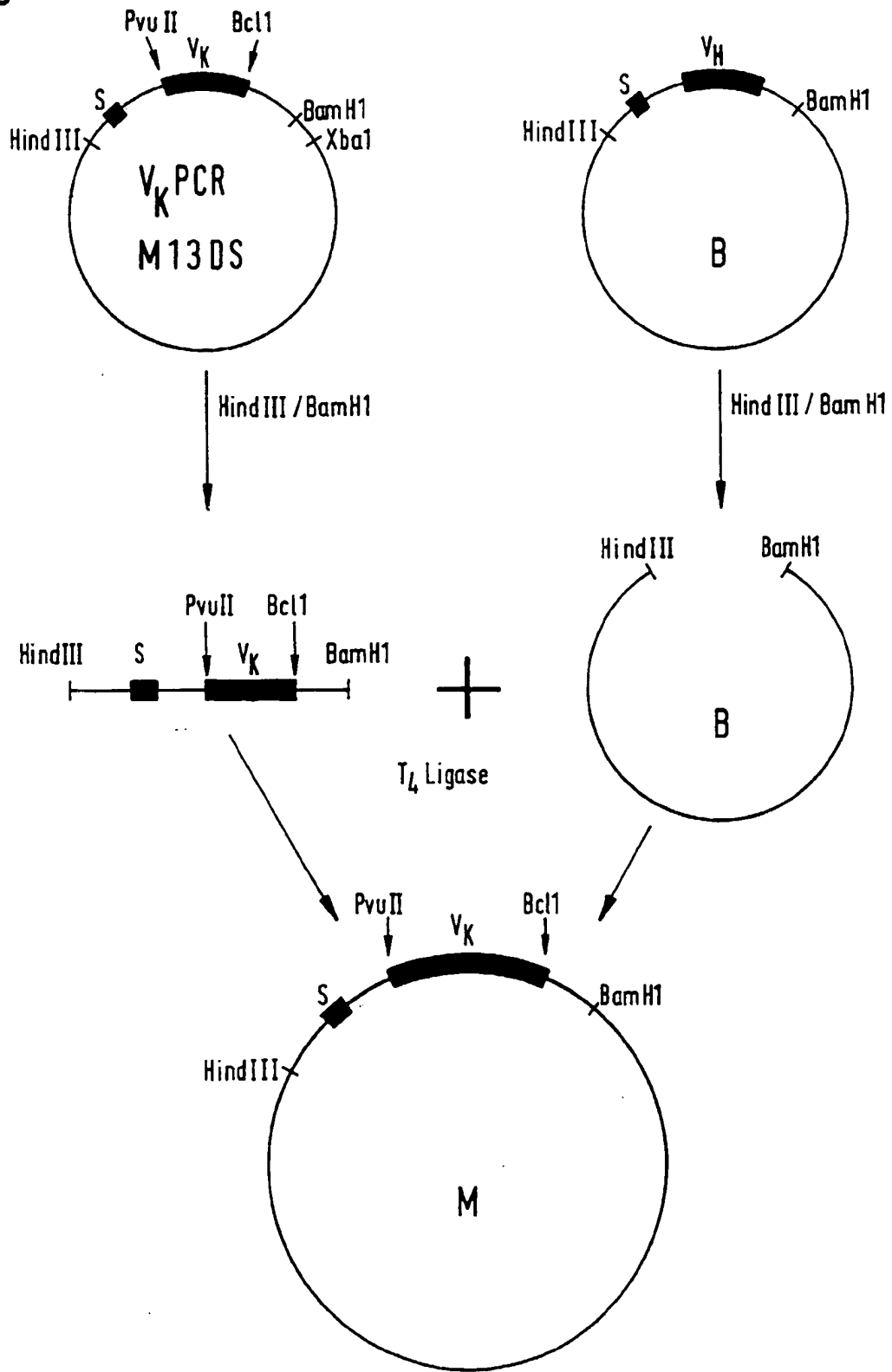
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.11



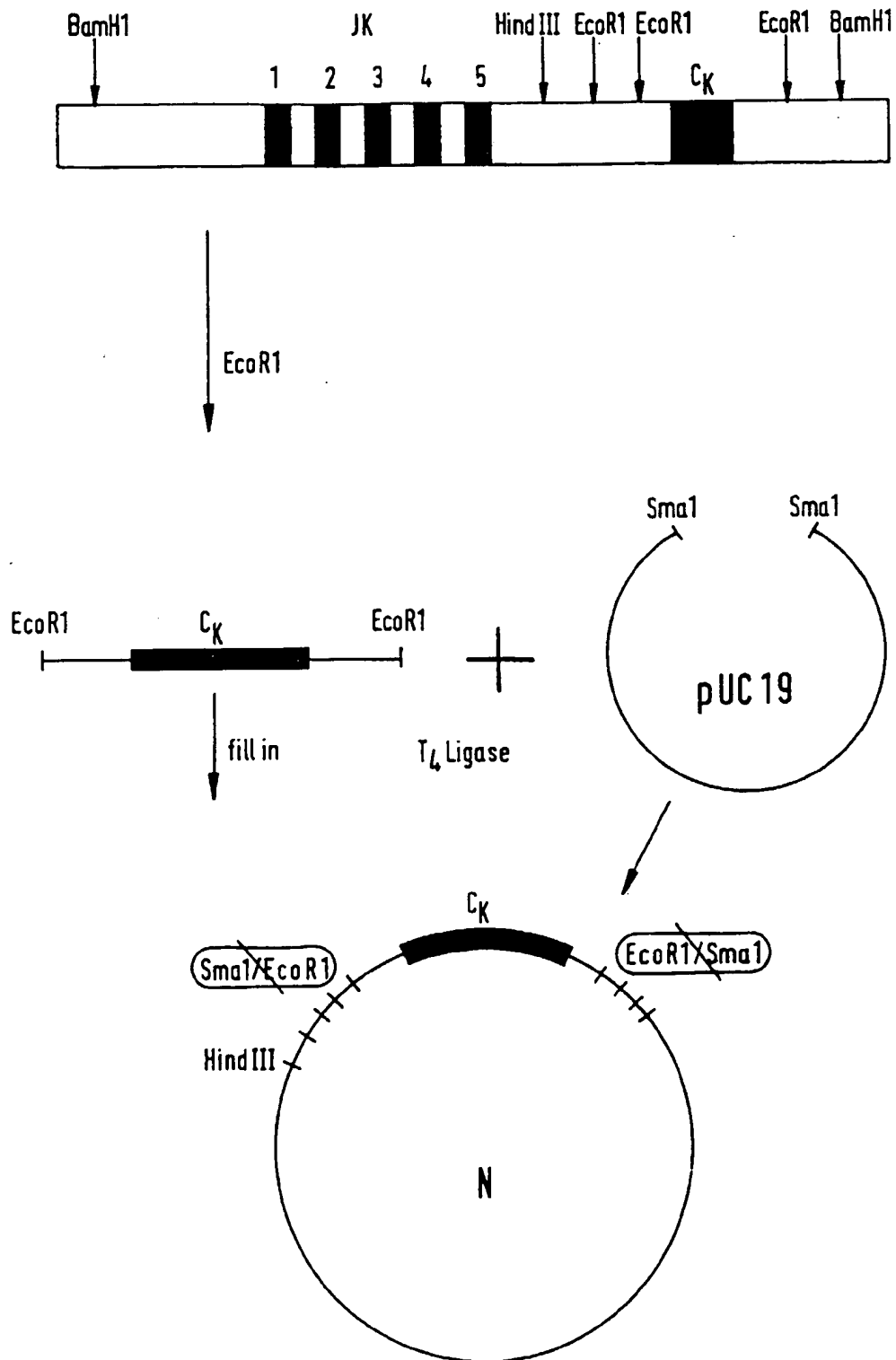
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.12



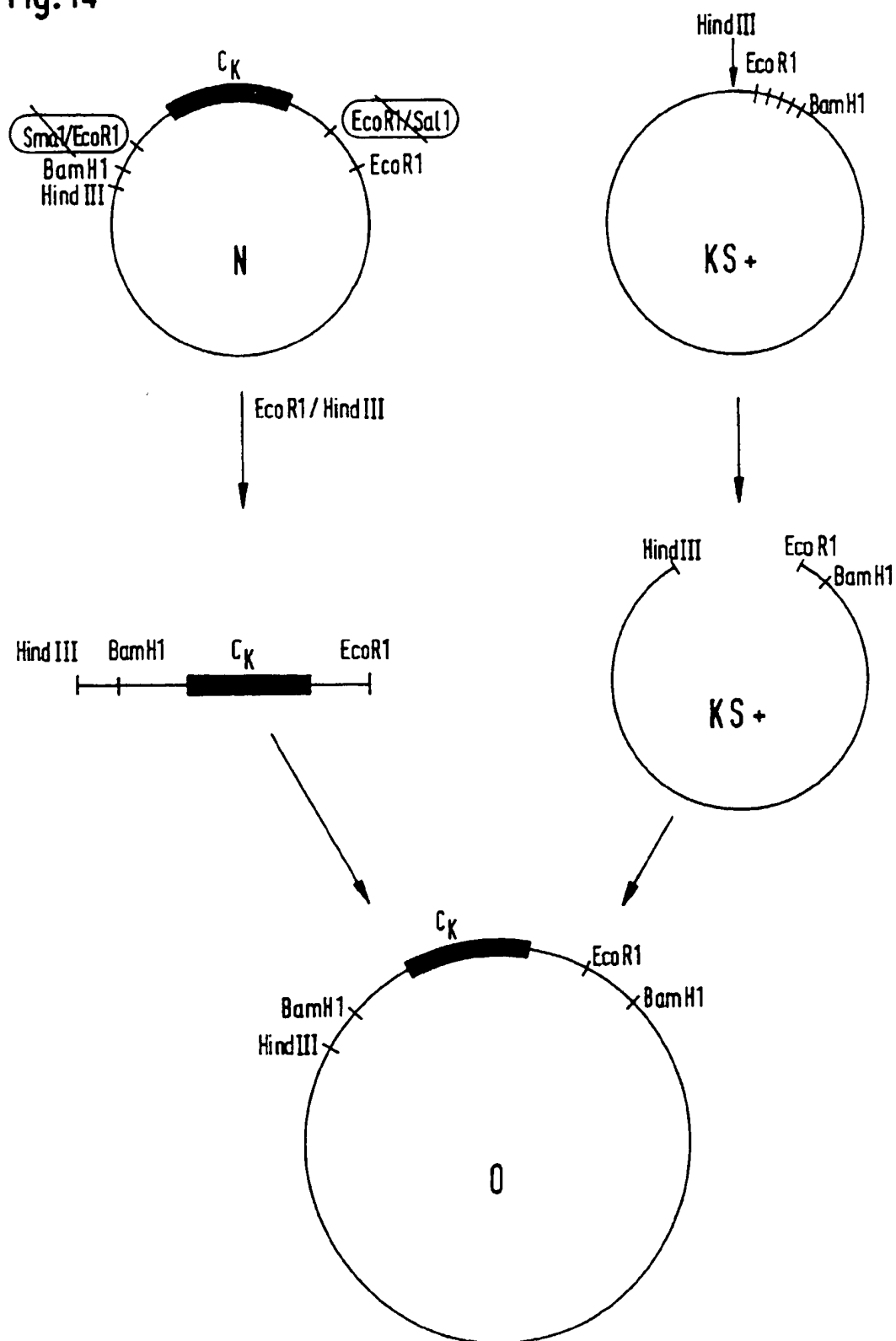
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.13



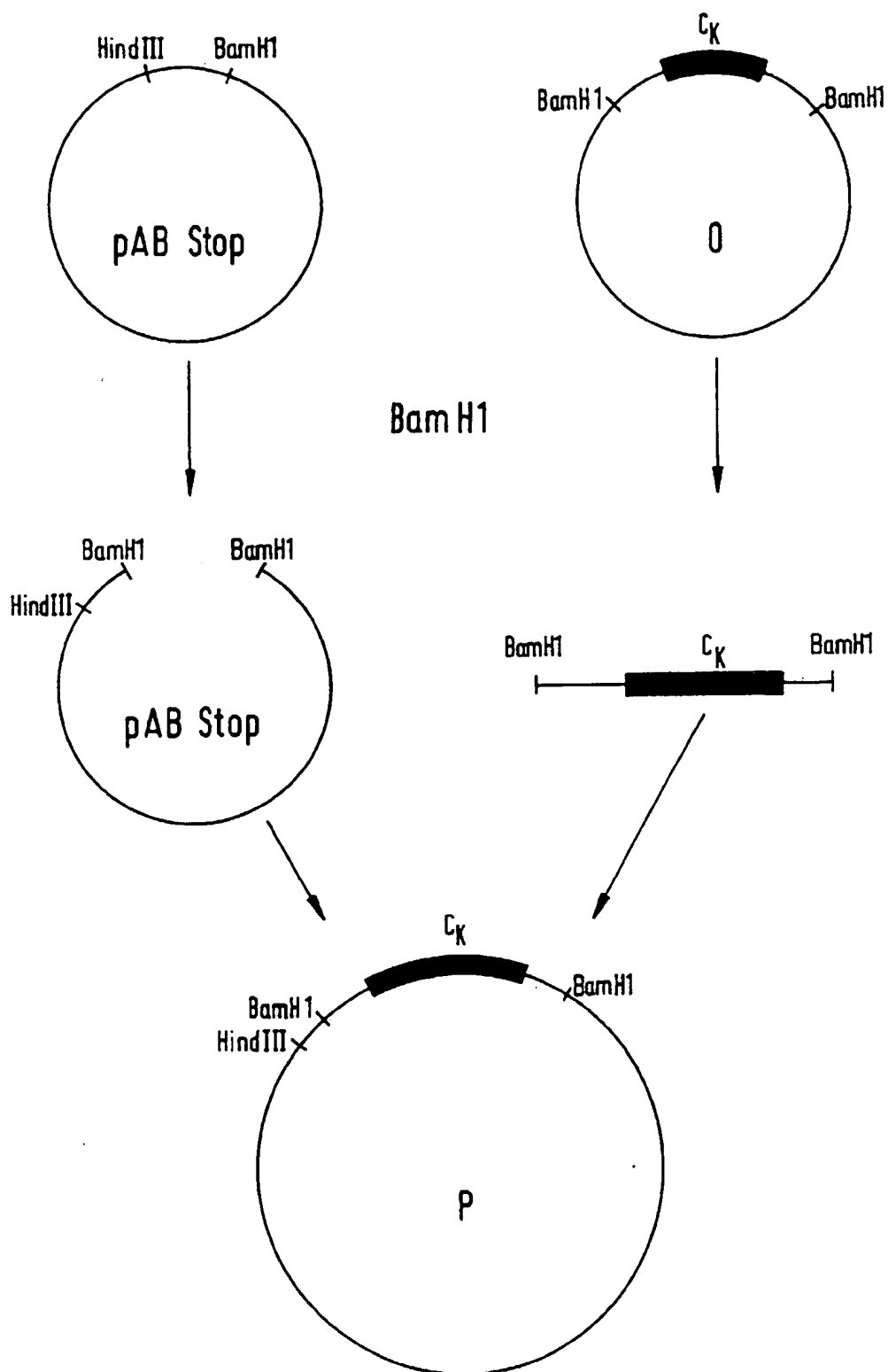
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 14



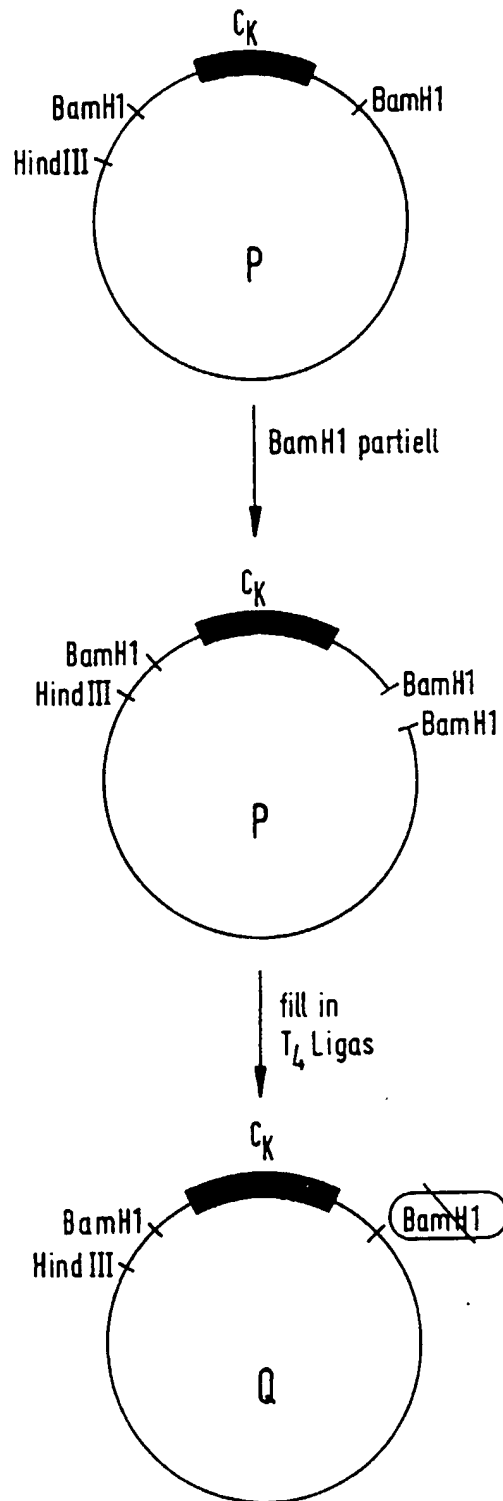
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.15



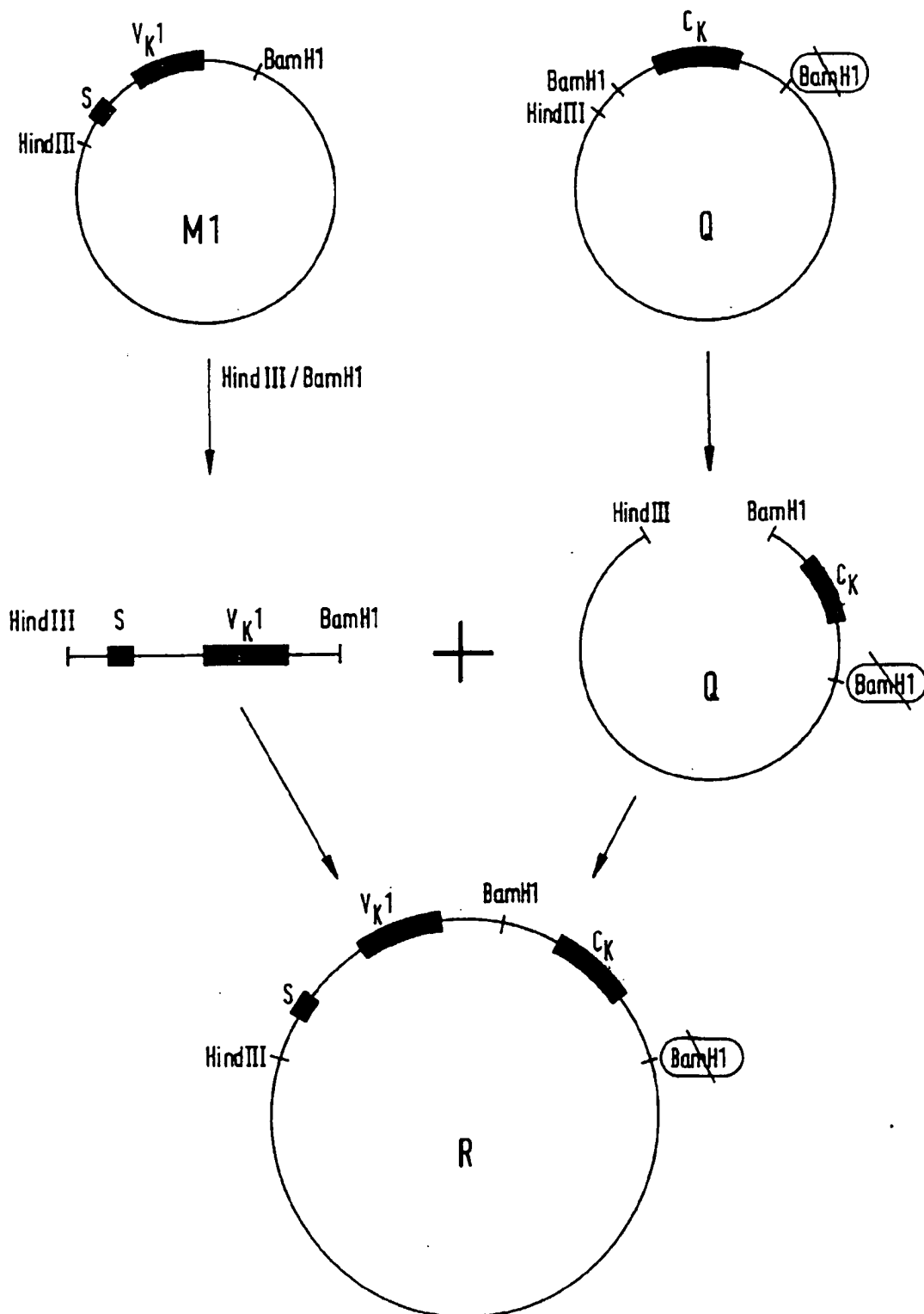
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.16



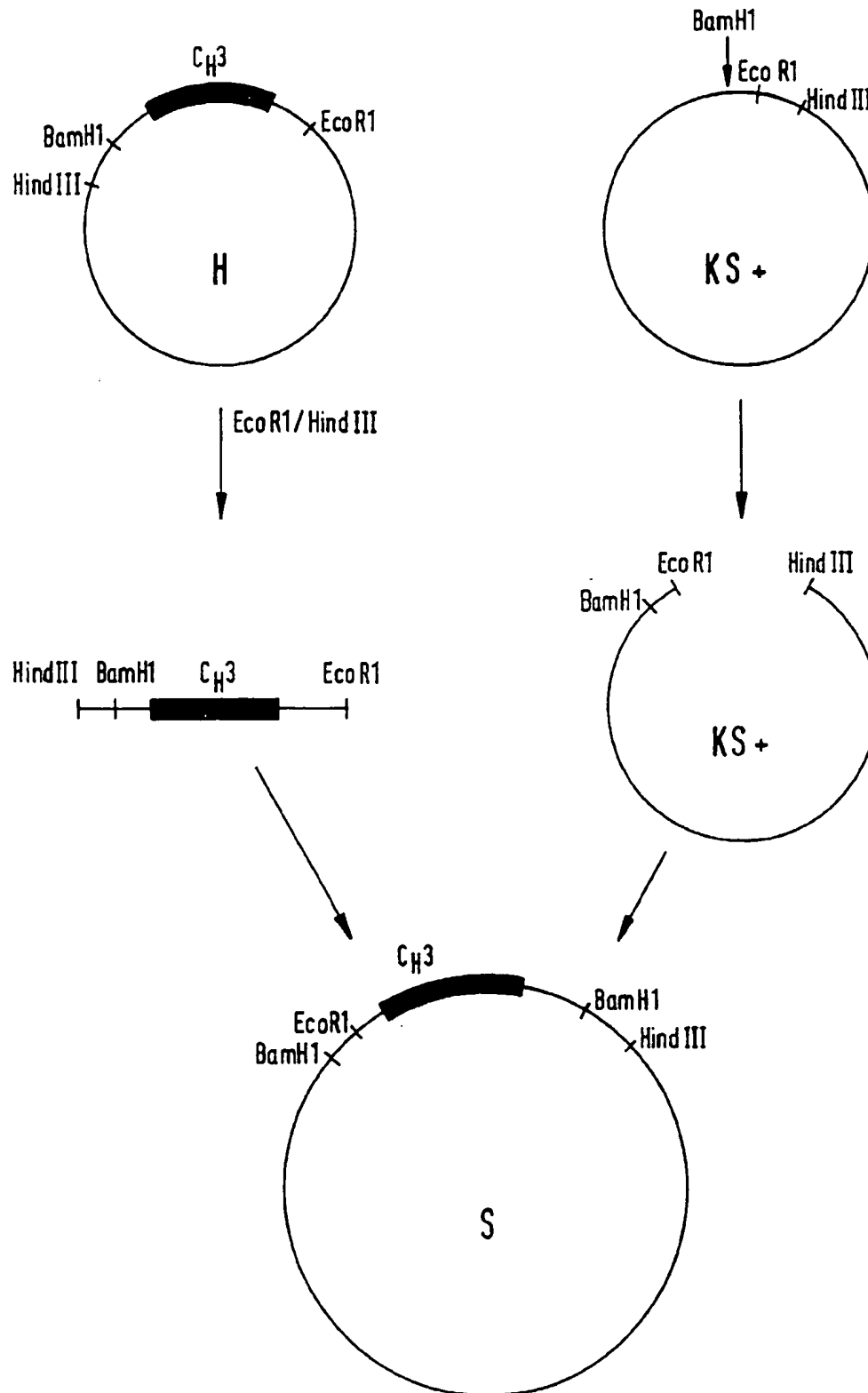
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.17



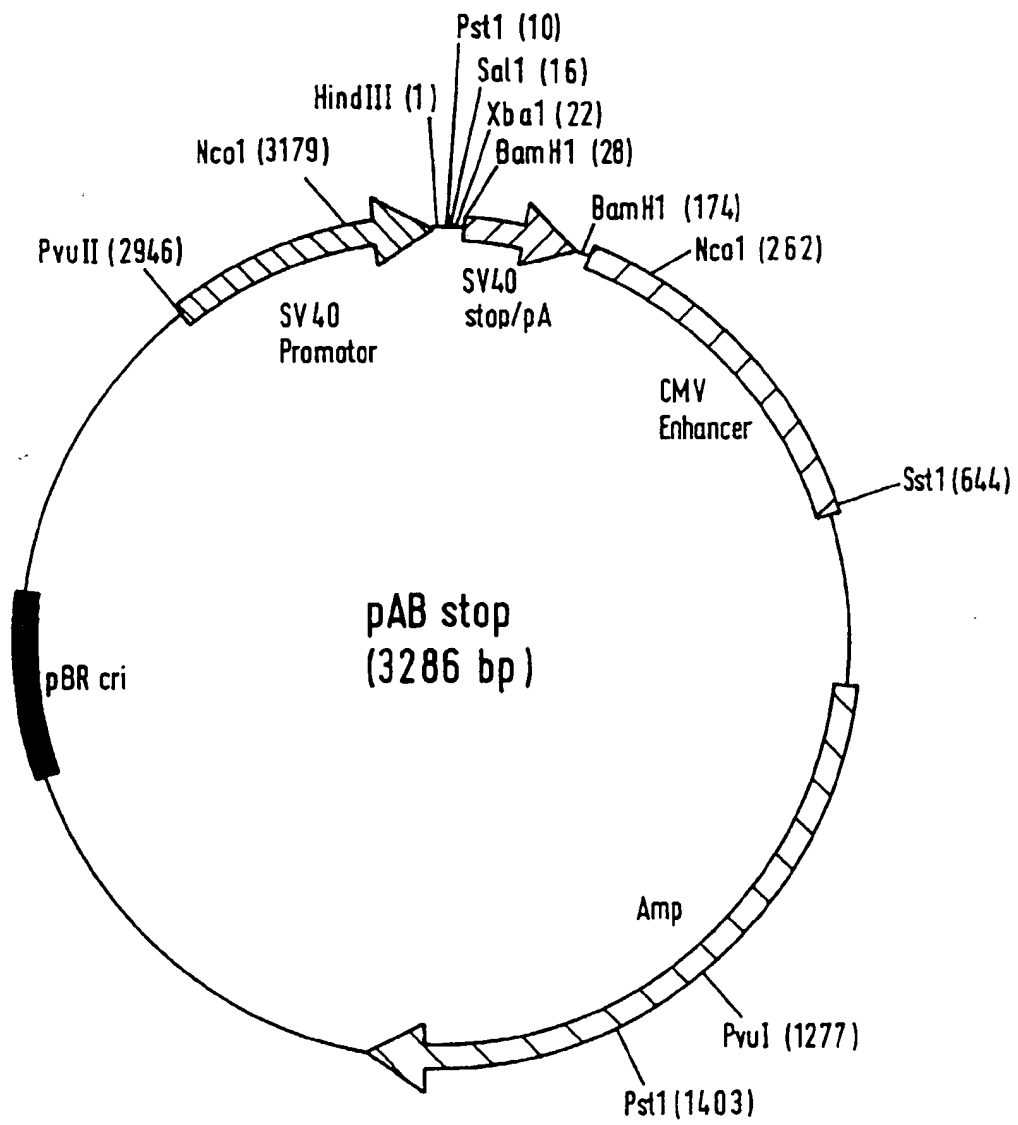
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.18



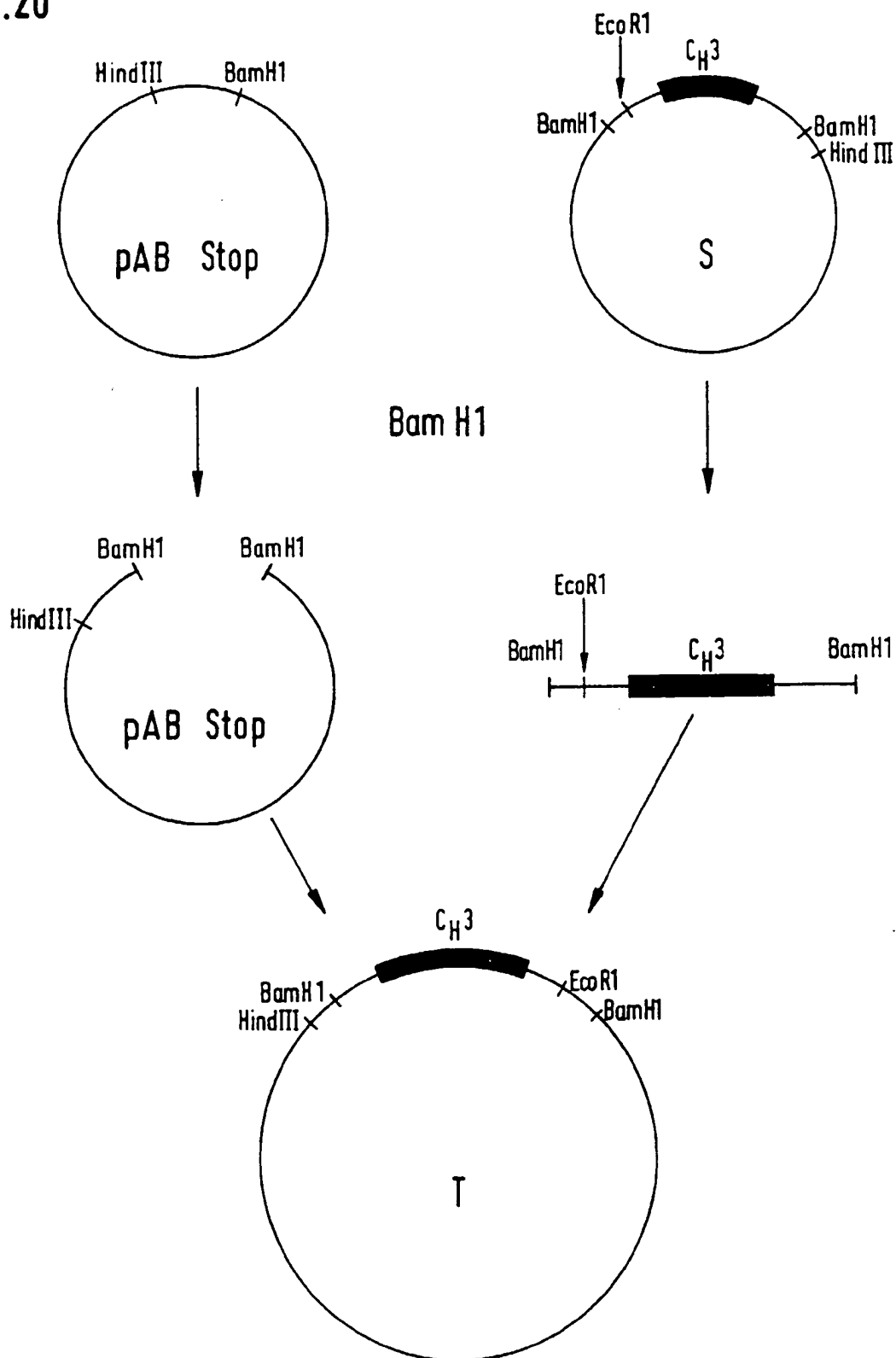
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.19



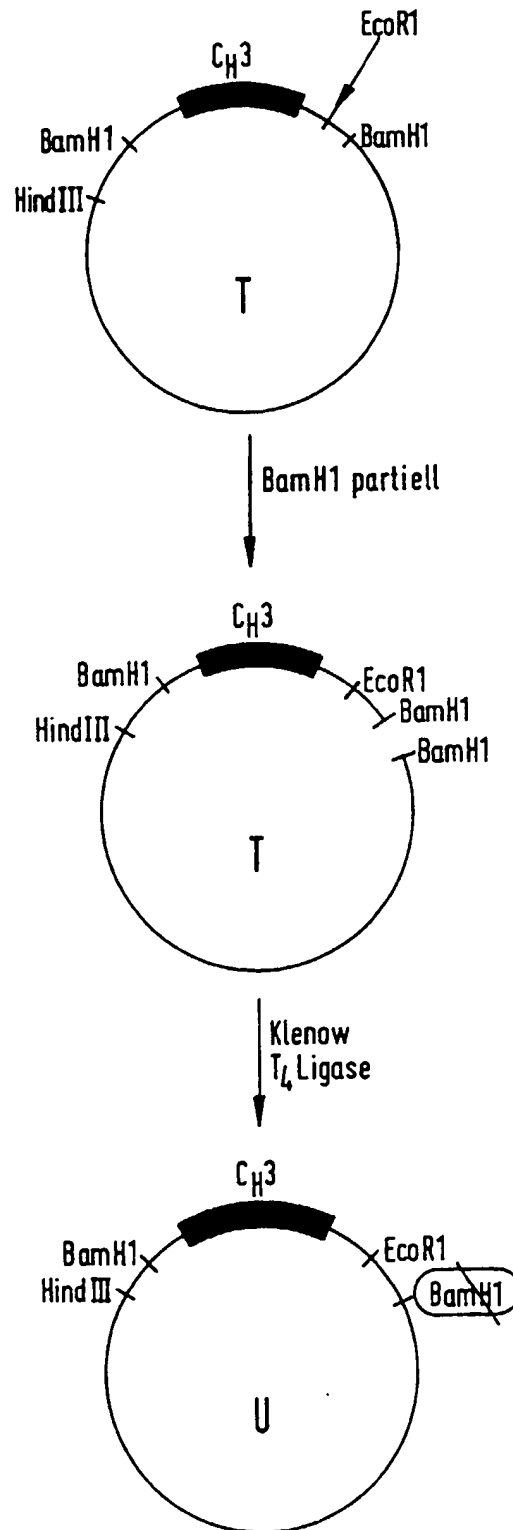
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.20



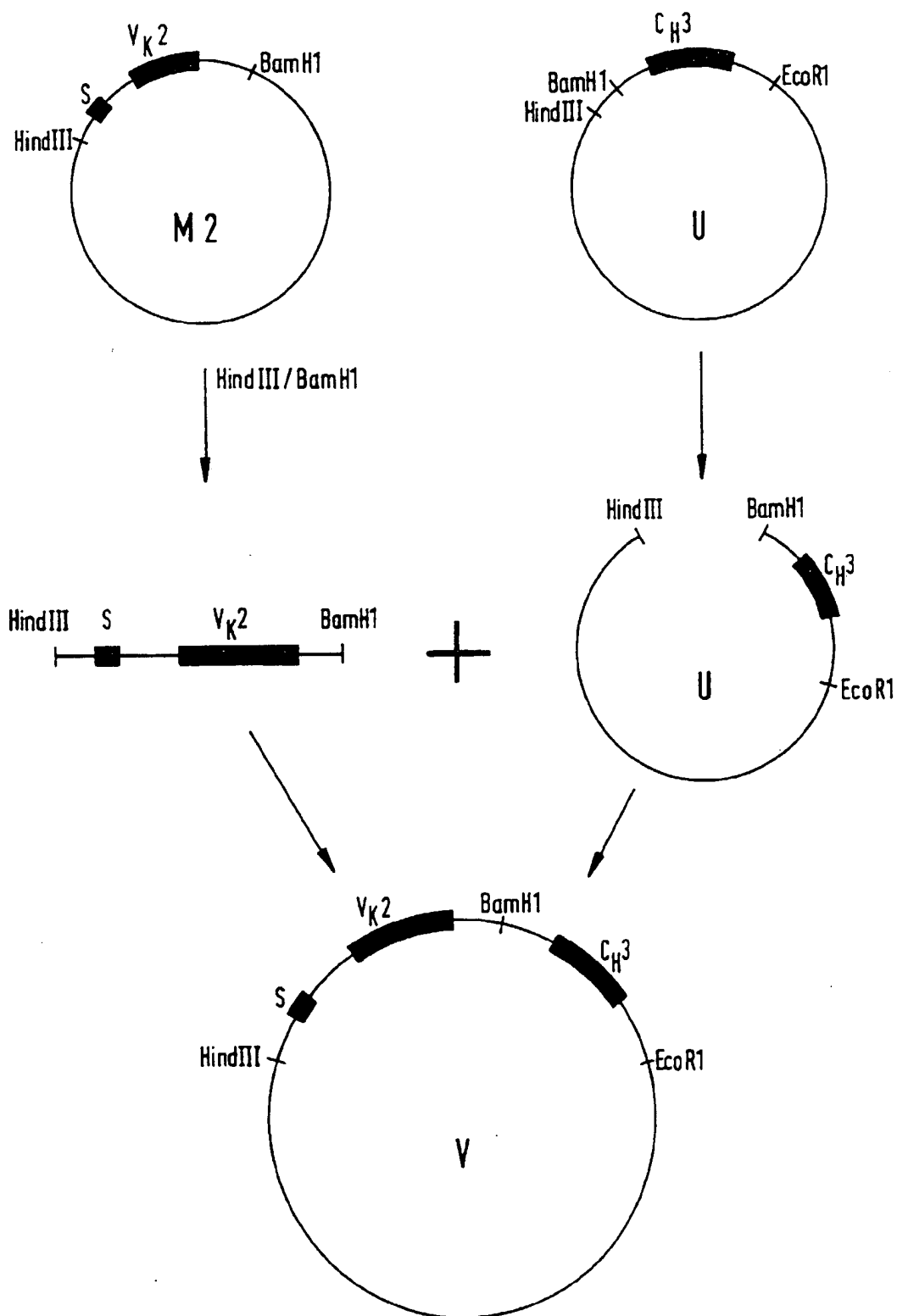
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 21



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 22



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.23

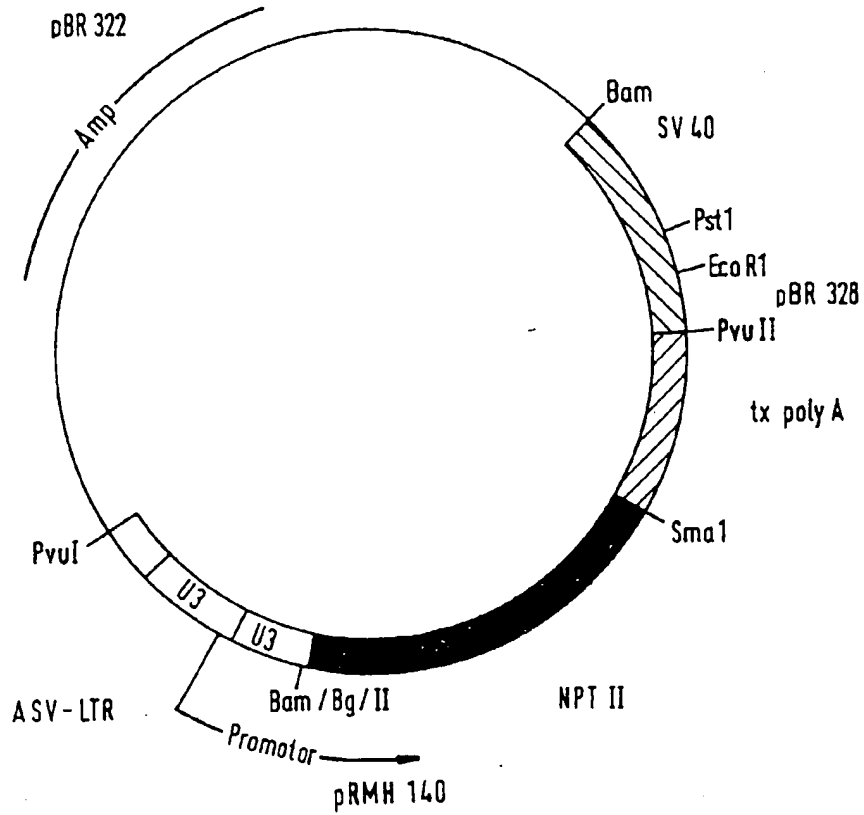
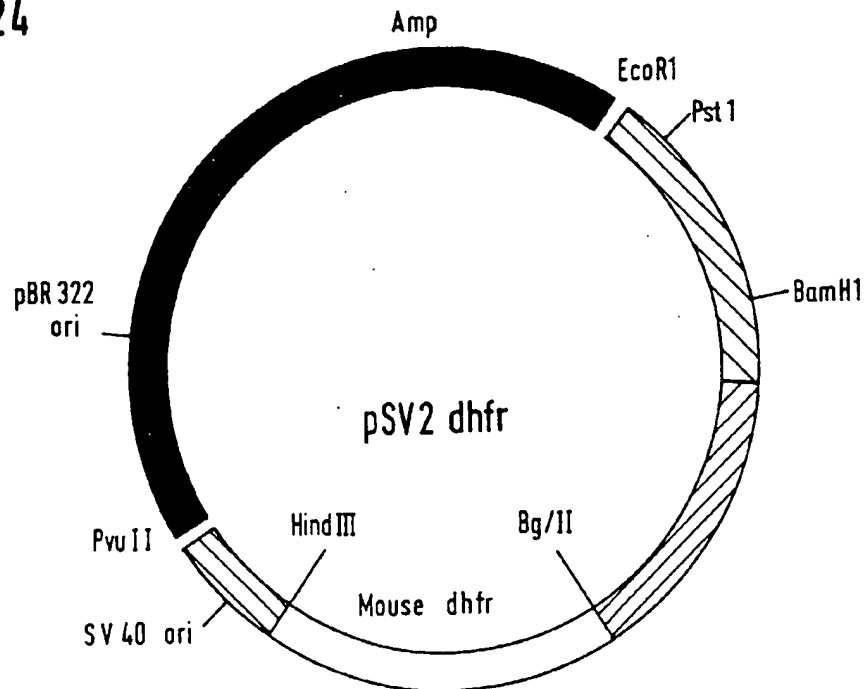


Fig.24



THIS PAGE BLANK (USPTO)